

# ACTA

## PHARMACEUTICA HUNGARICA

# 1.

## 2009

A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság tudományos folyóirata

APHGAO 79, (1) 1-44. (2009)



A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság Értesítője címmel megindította Lipták Pál 1925-ben



# ACTA PHARMACEUTICA HUNGARICA

A Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság folyóirata

*Főszerkesztő:*

Noszál Béla, Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészi Kémiai Intézet  
1092 Budapest, Hőgyes E. u. 9.  
Tel.: 217-0891;  
E-mail: nosbel@hogyes.sote.hu

*Felelős szerkesztő:*

Zelkó Romána, Semmelweis Egyetem, Egyetemi Gyógyszertár,  
Gyógyszerügyi Szervezési Intézet,  
1092 Budapest, Hőgyes E. u. 7-9.  
Tel.: 217-0927;  
E-mail: zelrom@hogyes.sote.hu

*A szerkesztőbizottság tagjai:*

Báthori Mária, Erős István, Gunda Tamás, Perjési Pál,  
Tóthfalusi László

*A szerkesztőség címe – Correspondence:*

Acta Pharmaceutica Hungarica  
1092 Budapest, Hőgyes Endre u. 9.

*A főszerkesztő munkatársa:*

Hankó Zoltán MGYT,  
1085 Budapest, Gyulai Pál u. 16.  
Tel.: 235-0999; fax: 235-0998

## TARTALOM

<i>Hevesi Tóth Barbara, Kéry Ágnes: Az Epilobium parviflorum kivonat hatásmechanizmusának in vitro vizsgálata</i> .....	3
<i>Blazics Balázs, Alberti Ágnes, Kéry Ágnes: Az Euphrasia rostkoviana Hayne fenoloid tartalmú frakcióinak antioxidáns értékelése</i> .....	11
<i>Hazai Eszter, Kovács Sándor, Demkó László, Bikadi Zsolt: DockingServer: molekuláris dokkolási számítások a böngészőben</i> .....	17
<i>Turmezeiné Horváth Judit, Dezsőfi Antal, Mátyus István: Enterális és „egyedi” parenterális táplálási terápia alkalmazása a gyermekgyógyászatban</i> .....	23
<i>Bölcскеi Éva, Bajdik János, Hódi Klára.: Felületen lejátszódó jelenségek szerepének vizsgálata a bevonó folyadékok előállítása során</i> .....	29
<i>Kovács Kristóf, Orosz Tamás, Stampf György, Antal István, Klebovich Imre, Ludányi Krisztina: Rossz vízoldékonyságú hatóanyagok parenterális gyógyszerformaként történő formulálásánál felmerülő problémák</i> .....	35

## CONTENTS

<i>Hevesi Tóth, B., Kéry, Á.: Epilobium parviflorum – In vitro study of biological action . . . . .</i>	3
<i>Blazics, B., Alberti, Á., Kéry, Á.: Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from Euphrasia rostkoviana Hayne . . . . .</i>	11
<i>Hazai, E., Kovács, S., Demkó, L. Bikadi, Zs.: DockingServer: Molecular docking calculations online . . . . .</i>	17
<i>Turmezei-Horváth, J., Dezsőfi, A., Mátyus, I.: Application of enteral and “individual” parenteral nutrition therapies in pediatric patients . . . . .</i>	23
<i>Bölskei, É., Bajdik, J., Hódi, K.: Evaluation of phenomena detected on the surface of stirred coating liquid . . . . .</i>	29
<i>Kovács, K., Orosz, T., Stampf, Gy., Antal, I., Klebovich, I., Ludányi, K.: Difficulties encountered during formulation of a parenteral dosage form containing a poorly soluble drug . . . . .</i>	35

Acta Pharmaceutica Hungarica: [www.mgyt.hu](http://www.mgyt.hu)

„Acta Pharmaceutica Hungarica” a Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság tudományos folyóirata  
 Kiadja a Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság, 1085 Budapest, Gyulai Pál u. 16. Telefon: 235-09-99; E-mail: szerkesztoseg@mgyt.hu  
**Felelős kiadó: Prof. Dr. Klebovich Imre**  
 Előfizethető: Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság, 1085 Budapest, Gyulai Pál u. 16., belföldi postautalványon vagy átutalással  
 az MGYT átutalási számlájára: OTP VIII. kerületi fiók, Budapest, József krt. 33.  
 MGYT elszámolási számla sz. 11708001–20530530  
 Adószám: 19000754–2–42  
 Előfizetési díj egész évre: 5133 Ft + 257 Ft áfa  
 Megjelenik negyedévenként. Példányszám: 1000 db  
 Tördelőszerkesztő: *Oláh Csaba*  
 Sokszorosítás: Arrabonaprint & Partners Zrt. (Felelős vezető: Ványik László)  
**Index: 25 101**

## Az *Epilobium parviflorum* kivonat hatásmechanizmusának *in vitro* vizsgálata

\*HEVESI TÓTH BARBARA, KÉRY ÁGNES

Semmelweis Egyetem, Farmakognózia Intézet, 1085 Budapest, Üllői út 26.

\*Levelező szerző: e-mail: hevesi.t.barbara@gmail.com

### Summary

Hevesi Tóth, B., Kéry, Á.: *Epilobium parviflorum* – *In vitro* study of biological action

*Epilobium parviflorum* Schreb. (willow-herb) is used for the treatment of benign prostatic hyperplasia (BPH), but its biological action is not entirely identified. This paper aims to report data on willow-herbs probable biological effect. *In vitro* studies have been made to investigate different aspects of its antioxidant capacity, anti-inflammatory (COX-inhibitory) action, steroid-receptor-agonistic and -antagonistic effect as well as aromatase-inhibitory effect. Based on our results, willow-herb possess remarkable antioxidant and COX-inhibitory action.

### Összefoglalás

A közlemény újabb információkkal kíván hozzájárulni egy, a jóindulatú prosztata megnagyobbodás kezelésében használt gyógynövény, az *Epilobium parviflorum* Schreb. (kisvirágú füzike) hatásával kapcsolatos ismeretekhez. A betegség kórfolyamatának összetevőit *in vitro* modellezve vizsgáltuk az *Epilobium parviflorum* oxidatív károsodással szemben tanúsított sejtvédő hatását, lipidperoxidáció-gátló, gyulladáscsökkentő (COX-enzim gátló), szteroidreceptor-agonista és -antagonista valamint aromatáz-enzim gátló hatását. Eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a kisvirágú füzike antioxidáns és COX-gátló hatással rendelkezik.

### 1. A jóindulatú prosztata megnagyobbodás

Statisztikai adatok szerint a jóindulatú prosztata megnagyobbodás (BPH) prevalenciája a 60 év feletti férfiak esetében több mint 50%, 70 év felett több mint 60%, 80 év felett pedig már a férfiak 90%-a érintett. A BPH patomechanizmusa rendkívül komplex, a mai napig nem teljesen tisztázott folyamat. A betegség megjelenése korfüggő és egyértelmű összefüggést mutat az időskori androgén-ösztrogén egyensúly felborulásával, de szerepe van néhány potenciális hajlamosító tényezőnek is, mint például a zsírban gazdag étrend, az alkoholfogyasztás vagy a genetikai hajlam [1, 2, 3, 4, 5]. A szakirodalom a kórfolyamatok közt említi a programozott sejthalál (apoptózis) elégtelen működését és az oxidatív stressz-folyamatok túlzott jelenlétét is. A BPH gyakori velejárója a prosztata gyulladása, ami a tüneteket tovább súlyosbítja [6, 7, 8].

A BPH kezelésében – a betegség stádiumától függően – elsődlegesen választandó szerek az 5  $\alpha$ -reduktáz inhibitorok (pl.: finasteride, dutasteride) és az  $\alpha_1$ -adrenerg-receptor antagonisták (pl.: prazosin, doxazosin, bunazosin, alfuzosin, tamsulosin, indoramin). Alkalmaznak továbbá néhány PDE<sup>1</sup>-inhibitor vegyületet (pl.: sildenafilil, tadalafil, vardenafil) és aromatáz-enzim gátló gyógyszert (pl.: atamestane). A klinikai vizsgálatok stádiumában van

egy GnRH<sup>2</sup> antagonistá gyógyszer (cetorelix) igen ígéretes eredményekkel [9, 10, 11].

A hatékonyság mellett azonban, a gyógyszeres terápia számlájára írható nagy hátrány a kedvezőtlen mellékhatások jelentkezése. Az alkalmazott készítmények legnehezebben tolerálható mellékhatásai közé tartozik a drasztikus vérnyomáscsökkenés, a szexuális funkciók zavara vagy akár a teljes impotencia [9, 12, 13, 14, 15]. Nem véletlen tehát, hogy a BPH kezelésében egyre nagyobb hangsúlyt kap a megelőzés és egyre népszerűbbek a kedvezőbb mellékhatás-profilú vagy mellékhatás-mentes gyógynövény alapú gyógyszerek, gyógyhatású készítmények, táplálék-kiegészítők. A legnagyobb urológiai szervezetek (EAU<sup>3</sup>, AUA<sup>4</sup>, Német Urológiai Társaság) által kiadott BPH kezelési irányelvek is elismerik a gyógynövény alapú készítmények jótékony hatását és kedvező mellékhatás-profilját, és javasolják a kiegészítő gyógynövény terápiát [12]. A BPH kezelésében leggyakrabban alkalmazott gyógynövény készítmények a *Serenoa repens* (Bartram) (fűrészpálma termés), *Pygeum africanum* (Hook) (afrikai szilvafa kéreg), *Hypoxis rooperi* (L.) (ormányliliom gyöktörzs), *Urtica dioica* (L.) (nagy csalán gyökér és levél),

<sup>1</sup> PDE: foszfodiészteráz

<sup>2</sup> GnRH: Gonadotropin Releasing Hormon

<sup>3</sup> EAU: European Association of Urology

<sup>4</sup> AUA: American Urological Association



*Cucurbita pepo* (L.) (közönséges tök mag), *Secale cereale* (Bieb.) (közönséges rozs pollen), *Epilobium parviflorum* (Schreb.) (kisvirágú füzike virágos hajtás) egyikét vagy keverékét tartalmazzák [12, 16, 17, 18].

## 2. *Epilobium parviflorum* Schreb. – kisvirágú füzike

Magyarországon a kisvirágú füzike (*Onagraceae*) tradicionális alkalmazása a prosztatatabántalmak kezelésében nagy múltra tekint vissza. A növény virágzó hajtását a teljes virágzás idején gyűjtik, szárítják és leggyakrabban teáját fogyasztják. Saját kísérleteink alapján a kisvirágú füzike hajtása polifenolokban gazdag (34,8 g / 100 g drog), főleg ellág- és galotannin származékokat, kvercetin-, miricetin- és kaempferol-glikozidokat tartalmaz [19]. Jellemző komponense az oenothein B, makrociklikus tannin, melyet a szakirodalom a feltételezett hatóanyagként emleget [19, 20, 21]. A drog fitoszterol komponenseit vizsgálva, kizárólag  $\beta$ -szitoszterolt azonosítottunk (0,13 g / 100 g drog).

A kedvező tapasztalatok és az egyértelmű fitoterápiás, szakirodalmi ajánlások ellenére az *Epilobium parviflorum* nem hivatalos az Európai Gyógyszerkönyvben (Ph. Eur. 5.) és ESCOP<sup>5</sup> monográfiával sem rendelkezik. Ennek lehetséges oka, hogy a csekély számú megbízható *in vitro* kísérlet alapján a klinikai vizsgálatok megalapozatlanok és az *Epilobium parviflorum* tudományos megítélése gyenge. Jelen értekezés újabb információkkal kíván hozzájárulni a kisvirágú füzike hatásával kapcsolatos ismeretekhez.

*In vitro* vizsgálatokat végeztünk a növény biológiai hatásmechanizmusának felderítésére. A betegség kórfolyamatának összetevőit modellezve, vizsgáltuk az *Epilobium parviflorum* oxidatív károsodással szemben tanúsított sejtvédő hatását, lipidperoxidáció-gátló, gyulladáscsökkentő (COX-enzim gátló), szteroidreceptor-agonista és antagonistá, valamint aromataz enzim gátló hatását. A közlemény összefoglaló ismertetése Hevesi Tóth et al. (2008) által már részben publikált módszereknek és eredményeknek [22].

## 3. Anyag és módszer

A vizsgálatokhoz saját termesztésű *Epilobium parviflorum* Schreb. növényanyagot használtunk. A drogot a virágzás kezdetén gyűjtött, a csúcsi virágok

alatt 30 cm-rel levágott és megszárított, leveles, virágos, természetes hajtás képezte. A frissen begyűjtött növényanyagot makro- és mikromorfológiai vizsgáló módszerekkel azonosítottuk. Az *Epilobium parviflorum* polifenol komponensekben leggazdagabb, acetonos (80% v/v) kivonatát vizsgáltuk.

### 3.1. Lipidperoxidáció-gátló hatás vizsgálata

A lipidperoxidáció a szervezetben történő oxidatív károsodások közül az egyik legismertebb folyamat, melynek elsősorban a membránalkotó lipidek vannak kitéve. Az oxidatív károsodás mértékének vizsgálatára az egyik leggyakrabban alkalmazott eljárás a lipidperoxidáció során keletkezett termékek, például a malondialdehid mennyiségének meghatározása. A malondialdehid (MDA) tiobarbitursavval (TBA) vörös színű komplexet képez, így mennyisége spektrofotometriás módszerrel meghatározható (532 nm).

Az alkalmazott vizsgálati modellben a membrán lipideket szarvasmarha agyból készített liposzómák szolgáltatták. Az oxidációs folyamatot  $\text{FeCl}_3$  és aszkorbinsav együttes hozzáadásával indítottuk el (Fenton reakció). A reakció során felszabadult hidroxil szabadgyökök a lipidek károsodását okozták, ami a malondialdehid felszaporodásához vezet. Antioxidáns vegyületek meggátolják a lipidperoxidációt, ezáltal csökken a képződött malondialdehid mennyisége és a MDA-TBA komplex színintenzitása [23, 24, 25]. A mért színintenzitás csökkenése arányos az antioxidáns hatás erősségével. Az *Epilobium parviflorum* kivonatának (0,014 – 10 mg/ml) lipidperoxidáció-gátló hatását ebben a tesztben (TBA) vizsgáltuk. Referenciaként egy természetes antioxidáns vegyületet, a propilgallátot használtuk [26]. Az értékelés során, a teljes lipidperoxidációt, a vak oldatot és a referenciát is figyelembe véve meghatároztuk a minta által kiváltott százalékos színintenzitás csökkenést (gátlási %) és azt a minta koncentrációt, ami a lipidperoxidáció mértékét 50%-kal csökkentette ( $\text{IC}_{50}$ ).

### 3.2. Citotoxicitás vizsgálata

A sejtenyészeteken végzett hatásvizsgálatokat megelőzően meggyőződünk arról, hogy az alkalmazott koncentrációban az *Epilobium parviflorum* kivonat nem citotoxikus az adott sejtvonalra nézve. A citotoxicitás vizsgálatát egyszerű, fluoreszcenciás sejtfestésen alapuló meghatározással végeztük. A módszerhez Alamar Blue ragenst használtunk [27, 28].

<sup>5</sup> ESCOP: European Scientific Cooperative on Phytotherapy

### 3.3. Antioxidáns védelem vizsgálata sejteken indukált, oxidatív károsodással szemben

Az oxigén alapú szabadgyökök tartós jelenléte és különösen magas szintje a szervezetben a sejtek oxidatív károsodásához vezet. Különösen érzékeny a bőr illetve (a prosztata epitél állományát is alkotó) fibroblaszt sejtszövet. Oxidatív stressz hatására a sejtek deformálódnak, rosszabb esetben elpusztulnak. A vizsgálat elvégzéséhez a Murrell (1990) és Yamasaki et al. (1994) által leírt, Mensah et al. által módosított (2001) tesztet alkalmaztuk [29, 30, 31]. A fibroblaszt sejteket hidrogén-peroxiddal ( $1 \times 10^{-4}$  M) kezeltük, majd mértük a sejtek túlélési arányát. A peroxidos kezelést megelőzően és/vagy azzal egy időben a *Epilobium* kivonattal (0,185 – 15  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) is kezeltük a sejteket, így következtetni tudtunk annak sejtvédő, antioxidáns hatására. A vizsgálathoz humán fibroblaszt sejteket (143RB sejtvonal) alkalmaztunk. Három eltérő mérési protokollt követtünk:

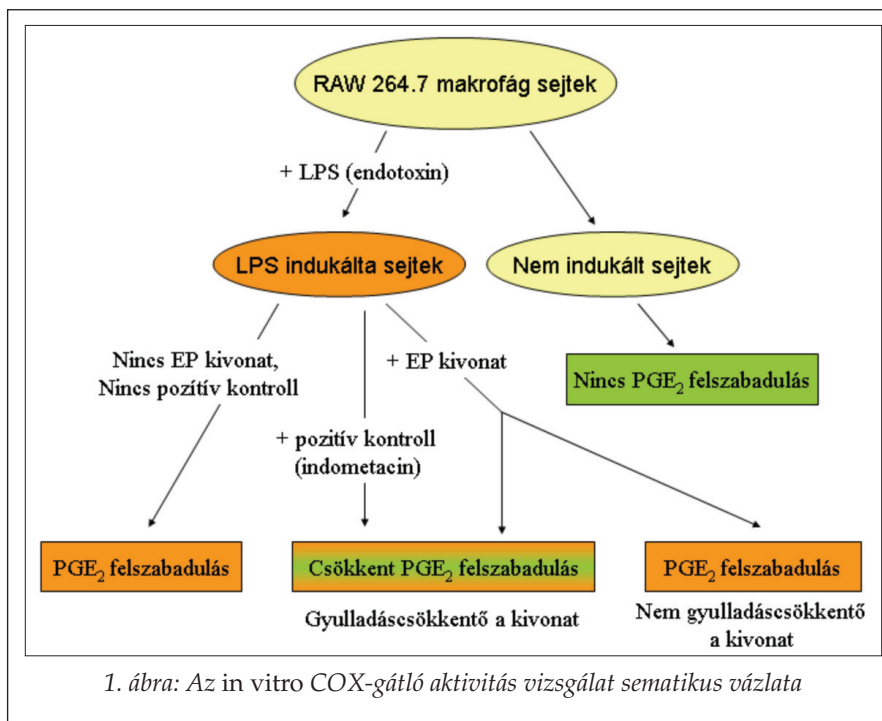
1. Már a peroxidos kezelést megelőzően a sejteket kezeltük az *Epilobium* kivonattal és egy éjszakán át inkubáltuk;
2. A peroxidos kezeléssel egy időben adtuk a kivonatot a sejtekhez;
3. A peroxidos kezelést megelőzően és azzal egy időben is kezeltük a sejteket a kivonattal. Az inkubációs idő után az életképes sejtek számát Neutral Red sejttestési eljárás segítségével mértük [32, 33]. Referenciaként egy  $\text{H}_2\text{O}_2$ -ot semlegesítő, antioxidáns enzimet, katalázt (250 IU/ml) alkalmaztunk. A teljes oxidatív károsodást, a vak oldatot és a referenciát is figyelembe véve meghatároztuk a minta által kiváltott százalékos sejtvédő hatást és azt a minta koncentrációt, ami a  $\text{H}_2\text{O}_2$  okozta oxidatív károsodás mértékét 50%-kal csökkentette ( $\text{IC}_{50}$ ).

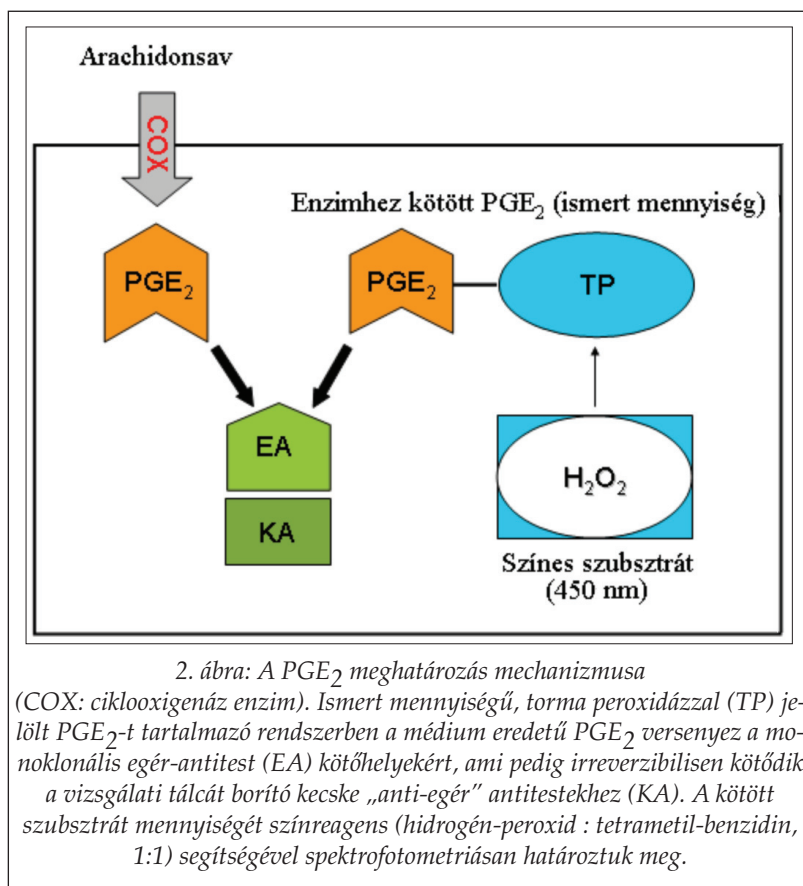
### 3.4. COX-gátló aktivitás vizsgálata

A ciklooxygenáz enzimek (COX-1 és COX-2) kulcsszerepet töltenek be az arachidonsav metabolizmusban. A ciklooxygenáz által katalizált reakciót követő folyamatban képződnek olyan, fontos fizi-

ológiai funkciót betöltő, lokális mediátorok, mint a prosztaglandinok (pl.  $\text{PGE}_2$ ) és a tromboxánok. Számos patológiai mechanizmusban megfigyelték a prosztaglandinok emelkedett koncentrációját, de egyik legismertebb funkciójuk a láz, a fájdalom és a gyulladás folyamatában van [34, 35].

Az *Epilobium parviflorum* kivonat (0,1 – 25  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) ciklooxygenáz gátló aktivitását *in vitro*,  $\text{PGE}_2$  felszabadulás mérésével vizsgáltuk humán makrofág sejteken (RAW 264.7 sejtvonal). A sejtek  $\text{PGE}_2$  termelését lipopoliszachariddal (LPS) indukáltuk, majd vizsgáltuk, mennyiben csökkent a termelt  $\text{PGE}_2$  mennyisége az *Epilobium* kivonat hatására. Referenciaként egy jól ismert, nem szelektív COX-gátló vegyületet, az indometacint használtuk. A vizsgálat vázlatát a 1. ábra mutatja be. Az inkubációs idő alatt termelődött  $\text{PGE}_2$  mennyiségét a médium vizsgálatával határoztuk meg. A felszabadult  $\text{PGE}_2$  mennyiségi meghatározását egy vizsgálati tesztcsomag (R&D Systems:  $\text{PGE}_2$  assay kit) segítségével végeztük. A tesztcsomag által kínált  $\text{PGE}_2$  meghatározás kompetitív immunkötődési mechanizmuson alapul. A mérés mechanizmusának egyszerűsített sémáját a 2. ábra mutatja be. A vizsgálat során mért színintenzitás fordítottan arányos a képződött  $\text{PGE}_2$  koncentrációjával. A kalibrációhoz használt  $\text{PGE}_2$  kalibrációs sorozat segítségével meghatároztuk az *Epilobium* kivonattal kezelt sejtek  $\text{PGE}_2$  termelését és következtettünk a kivonat által kifejtett COX-gátló hatásra.





### 3.5. Ösztrogén-/androgénreceptor-kötő aktivitás vizsgálata

Az *Epilobium parviflorum* kivonatát (0,01 – 1000 µg/ml) olyan *in vitro* tesztrendszerben vizsgáltuk, amely alkalmas az ösztrogén- vagy androgénreceptorhoz való kötődés kimutatására. A vizsgálatot Routledge és munkatársai (1995) dolgozták ki [36]. A méréshez speciálisan kifejlesztett élesztőgomba-sejtvonal (*Saccharomyces cerevisiae*) szükséges. Az élesztőgomba sejtei eredetileg nem tartalmaznak sem ösztrogén- (ÖR) sem androgénreceptort (AR), ezért a receptorok DNS szekvenciáit (hÖR/hAR) a sejt kromoszóma-állományába integrálták. A sejtek tartalmaznak továbbá, *Lac-Z* riporter gént (β-galaktozidáz enzimet kódolja) és ösztrogén-/androgén-érzékeny szekvenciát hordozó plazmidot is. A módszer alapjául szolgáló mechanizmusokat a 3. ábra mutatja be. Amennyiben az ösztrogén- vagy androgénreceptorhoz ligand kötődik, a plazmid hormon-érzékeny szekvenciája aktiválja a *Lac-Z* gént, ami a β-galaktozidáz termelődéséhez vezet. A β-galaktozidáz a médiumba kerül és katalizálja a médiumhoz kevert sárga színanyag (CPRG) átalakulását vörössé. A színváltozás spektrofotometriásan mérhető (540 nm), így a hormonreceptorhoz

való kötődés nyomon követhető [36, 37]. Ez az *in vitro* rendszer nagyon érzékeny (pl. már  $7,34 \times 10^{-12}$  M 17β-öszt-radiol hatására is termelődik β-galaktozidáz). Referenciaként 17β-öszt-radiolt (ÖR kötődés vizsgálathoz) és tesztoszteront (AR kötődés vizsgálat-hoz) használtunk.

### 3.6. Antiösztrogén-/antiandrogén-receptor-kötő aktivitás vizsgálata

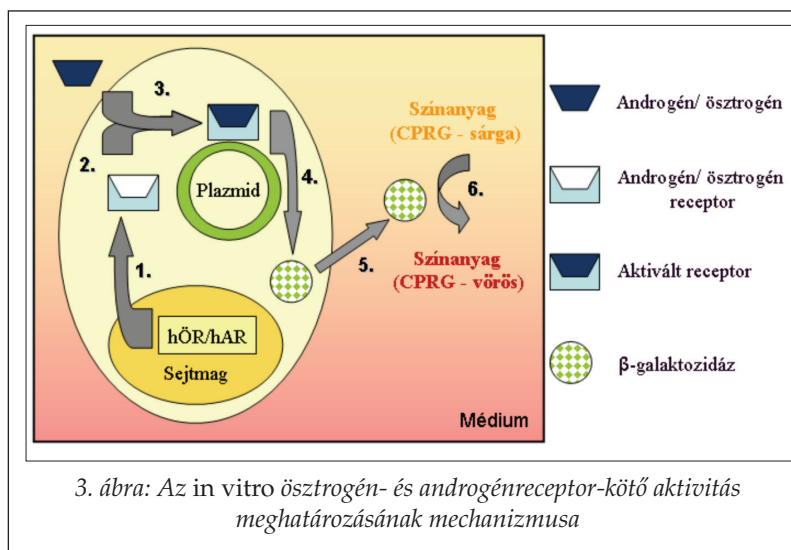
Amennyiben a vizsgált kivonathoz referencia vegyületet keverünk, a mérés alkalmassá válik az anti-ösztrogén vagy anti-androgén receptorkötő aktivitás vizsgálatára. A mérési protokoll teljes egészében megegyezik a 3.5. bekezdésben leírt méréssel, azzal a különbséggel, hogy a kivonatokkal együtt adott koncentrációjú 17β-öszt-radiol vagy tesztoszteron referencia-oldatot is adtunk a sejtekhez [36, 37]. A minták mellé adott referencia koncentrációját (15 nM) a 3.5. részben leírt mérés során felvett kalibrációs görbék alapján határoztuk meg.

### 3.7. Aromatáz enzim gátló hatás vizsgálata

Az aromatáz enzim az ösztrogén bioszintézis egyik kulcsenzime. Az aromatáz katalizálja az androszténdion → öszttron átalakulást, valamint a tesztoszteron egy része is aromatáz hatására alakul 17β-öszt-radiollá [38]. Ma már nemcsak a mellrák, illetve méhnyak-rák kezelésében, hanem a BPH terápiájában és a prosztatara hormonális prevenciójában is alkalmaznak aromatázgátló vegyületet (pl. atamestane) [2, 10, 38]

Az *Epilobium parviflorum* kivonat aromatáz enzimgátló hatását humán koriokarcinomás placenta sejtvonalon (JEG3) vizsgáltuk. A vizsgálati módszert, Reed, Purohit és munkatársai dolgozták ki [39, 40]. A placenta sejtek aromatáz aktivitását vizsgáltuk egy ismert aromatázgátló vegyület (letrozol, 10 nM), illetve *Epilobium* kivonat (0,32 – 3,2 µg/ml) jelenlétében. Az aromatáz enzim szubsztrátjaként ismert mennyiségű, tríciummal jelölt androszténdiont ([1 <sup>3</sup>H] androszténdion, <sup>3</sup>H-A) adtunk a rendszerhez, ami az aromatáz hatására öszttronná alakul, miközben a trícium a médiumba kerül (<sup>3</sup>H<sub>2</sub>O formában). A feleslegben maradt, jelölt androszténdion mennyiségét aktív szénnel (dextránnal kötött

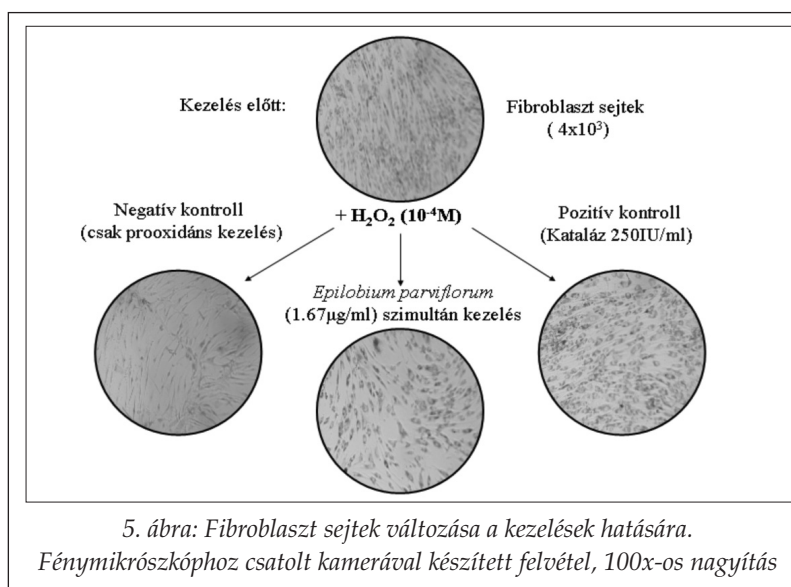
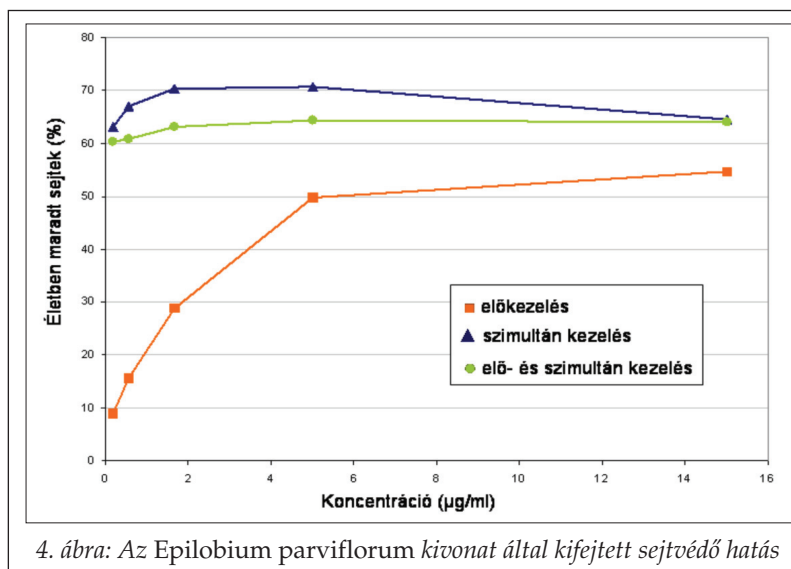




szén: DCC) megkötöttük. A minták sugárzását ( $^3\text{H}_2\text{O}$  tartalmát) szcintillációs számláló segítségével határoztuk meg. Az aromatáz aktivitására, illetve az *Epilobium* kivonat aromatáz gátló aktivitására a médium radioaktivitásának intenzitásából következtettünk.

#### 4. Eredmények

Az alkalmazott *in vitro* rendszerben az *Epilobium parviflorum* kivonata koncentrációfüggően gátolta a lipidperoxidációt 0,20 mg/ml koncentráció felett. A lipidperoxidáció 50%-os gátlásához szükséges *Epilobium* koncentráció ( $\text{IC}_{50}$ )  $2,37 \pm 0,12$  mg/ml. A 0,20 mg/ml alatti koncentráció-tartományban a kivonat prooxidáns tulajdonságot mutatott. Azonos körülmények között a pozitív kontrollként használt,  $10^{-4}$  M koncentrációjú propil-gallát 50%-os gátlást mutatott. A vizsgált koncentráció-tartományban az *Epilobium* kivonat határozott antioxidáns védelmet nyújtott a fibroblaszt sejteken indukált oxidatív károsodással szemben. A sejtvédő hatás koncentráció-függő és erőssége a kataláz enzim sejtvédő hatásával összemérhető volt. Azonos körülmények között a kataláz enzim (250 IU/ml) a sejtek 64%-ának nyújtott védelmet. A peroxidos kezeléssel szimultán történő *Epilobium* kezelés bizonyult a leghatásosabbnak, míg a leggyengébb sejtvédő hatást az előkezelt sejtek esetében figyeltük meg (4. ábra). A fibroblaszt sejtek számának változását és az esetleges deformitásokat a kezelések hatására fénymikroszkóppal vizsgáltuk. A kezelések hatására történő sejtszám változás sejtfestés nélkül is megfigyelhető volt (5. ábra).



A COX-gátló hatás vizsgálata során az *Epilobium parviflorum* kivonata koncentráció-függő COX enzimgátló hatást mutatott ( $\text{IC}_{50} = 1,4 \pm 0,1$  µg/ml), tehát gyulladáscsökkentő aktivitása feltételezhető. Azonos körülmények között a referenciaként használt indometacin  $21 \pm 3$  µM koncentrációban 50%-kal csökkentette ( $\text{IC}_{50}$ ) a felszabadult  $\text{PGE}_2$  mennyiségét.

Az ösztrogén-/androgénreceptor-kötő aktivitás mérési eredmények alapján megállapítottuk, hogy az *Epilobium parviflorum* kivonat, a vizsgált koncentráció-tartományban (0,01 – 1000 µg/ml) nem mutatott receptorkötő aktivitást sem az ösztrogén, sem az androgénreceptoron. Az antiösztrogén/antiandrogén aktivitás vizsgálat eredményei alapján az *Epilobium parviflorum* kivonat, a vizsgált koncentráció-tartományban (0,01 – 1000 µg/ml) nem gátolta szignifikáns mértékben a 17β-ösztrodiol vagy a tesztoszteron receptorkötődését, tehát nem fejtett ki sem antiösztrogén, sem antiandrogén aktivitást. Az aromatáz enzim gátló hatás vizsgálata során az *Epilobium* kivonat aromatáz gátló hatást mutatott (20-30%) a vizsgált koncentráció-tartományban (0,32 – 3,2 µg/ml), de a különböző koncentrációk esetében mért eredmények óriási (>30%) szórása miatt az aktivitások különbsége nem mondható szignifikánsnak.

### 5. Következtetések

Az *Epilobium parviflorum* biológiai hatását *in vitro* tesztrendszerekben vizsgáltuk. A kivonat határozottan gátolta a lipidperoxidációt és sejtvédő hatást mutatott az oxidatív károsodásnak kitett fibroblaszt sejteken. A füzike kivonata COX-gátló aktivitással is rendelkezett. Eredményeink alapján következtünk a kisvirágú füzike antioxidáns és gyulladás-csökkentő aktivitására, ami feltételezhetően hozzájárul a drog jótékony hatásához. Az alkalmazott *in vitro* tesztrendszerekben végzett szteroidreceptor-kötő aktivitás mérés alapján az *Epilobium parviflorum* receptorális szinten nem befolyásolja a szteroidhormon-háztartást. Következtetéseink alapján az *Epilobium parviflorum* acetonos (80%) kivonata a vizsgált koncentráció-tartományban nem rendelkezik meggyőző aromatáz enzim gátló aktivitással. Szükséges megjegyezni azonban, hogy az elvégzett vizsgálat alapján az *Epilobium parviflorum* aromatáz gátló aktivitása nem zárható ki teljes mértékben. Az eredményekben tapasztalt óriási szórás metodikai hibára is utalhat, aminek felderítése további vizsgálatok tárgyát képezi. A kisvirágú füzike szélesebb körű indikációban történő, evidenciákon alapuló alkalmazásához további *in vitro* és *in vivo* hatásvizsgálatok elvégzése szükséges.

### IRODALOM

- Corica, F.A., Cheng, L., Ramnani, D., Pacelli, A., Weaver, A., Corica, A.P., Corica, A.G., Larson, T.R., O'Toole, K., Bostwick, D.G.: *Urology* 56, 76–81 (2000)
- Brawley, O.W.: *Urol. Oncol.* 21, 67–72 (2003)
- Thorpe, A., Neal, D.: *Lancet* 361, 1359–1367 (2003)
- Prins, G.S., Korach, K.S.: *Steroids* 73, 233–244 (2008)
- Vermeulen, A.: *Maturitas* 34, 5–15 (2000)
- Lee, K.L., Peehl, D.M.: *J. Urol.* 172, 1784–1791 (2004)
- Mirone, V., Fusco, F., Verze, P., Schulman, C., Debruyne, F., Imbimbo, C.: *Europ. Urol. Suppl.* 5, 410–417 (2006)
- Sciarra, A., Mariotti, G., Salciccia, S., Autran Gomeza, A., Monti, S., Toscano, V., Di Silverio, F.: *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 108, 254–260 (2008)
- Hieble, J.P.: *Drug Discov. Today Ther. Strateg.* 1, 243–248 (2004)
- Fathy, M., Etreby, E.L.: *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 44, 565–572 (1993)
- Debruyne, F., Gres, A.A., Arustamov, D.L.: *Eur. Urol.* 54, 170–180 (2008)
- Madersbacher, S., Ponholzer, A., Berger, I., Marszalek, M.: *EAU-EBU Update Ser.* 5, 197–205 (2007)
- Madersbacher, S., Marszalek, M., Lackner, J., Berger, P., Schatzl, G.: *Eur. Urol.* 51, 1522–1533 (2007)
- Rosen, R.C., Giuliano, F., Carson, C.C.: *Eur. Urol.* 47, 824–837 (2005)
- Costa, P.: *Sexologies* 17, 12–12 (2008)
- Capasso, F., Gaginella, T.S., Grandolini, G., Izzo, A.A.: *Phytotherapy*, Springer, Germany 241(2003)
- Steenkamp, V.: *Fitoterapia* 74, 545–552 (2003)
- Dedhia, R.C., McVary, K.T.: *J. Urol.* 179, 2119–2125 (2008)
- Hevesi-Tóth, B., Blazics, B., Kéry, Á.: *J. Pharm. Biomed. Anal.* doi:10.1016/j.jpba.2008.09.047 (2008)
- Lesuisse, D., Berjonneau, J., Ciot, C., Devaux, P., Doucet, B., Gourvest, J.F., Khemis, B., Lang, C., Legrand, R., Lowinski, M., Maquin, P., Parent, A., Schoot, B., Teutsch, G.: *J. Nat. Prod.* 59, 490–493 (1996)
- Vitalone, A., Guizzetti, M., Costa, L.G., Tita, B.: *J. Pharm. Pharmacol.* 5, 683–690 (2003)
- Hevesi-Tóth, B., Houghton, P.J., Habtemariam, S., Kéry, Á.: *Phytother. Res.* 22, doi: 10.1002/ptr.2725 (2008)
- Ohkawa, H., Ohishi, N., Yagi, K.: *Anal. Biochem.* 95, 351–358 (1979)
- Buege, J.A., Aust, S.D.: *Methods Enzymol.* 52, 302–310 (1978)
- Cailliet, S., Yu, H., Lessard, S., Lamoureux, G., Ajdukovic, D., Lacroix, M.: *Food Chem.* 100, 542–552 (2007)
- Kahl, R., Hildebrandt, A.G.: *Food Chem. Toxicol.* 24, 1007–1014 (1986)
- Nakayama, G.R., Caton, M.C., Nova, M.P., Parandoosh, Z.: *J. Immunol. Methods* 204, 205–208 (1997)
- www.ab-direct.com (2006) AbD Serotec – alamarBlue (No.:BUF012)
- Murrell, G.A.C., Francis, M.J., Bromley, L.: *Biochem. J.* 265, 659–665 (1990)
- Yamasaki, T., Li L., Lau, B.H.S.: *Phytother. Res.* 8, 408–412 (1994)
- Mensah, A.Z., Sampson, J., Houghton, P.J., Hylands, P.J., Westbrook, J., Dunn, M., Hughes, M.A., Cherry, G.W.: *J. Ethnopharmacol.* 77, 219–226 (2001)

32. Lee, J.K., Kim, D.B., Kim, J.I., Kim, P.Y.: Toxicol. In Vitro 14, 345-349 (2000)
33. Babich, H., Visioli, F.: Farmaco 58, 403-407 (2003)
34. Jain, N.K., Ishikawa, T., Spigelman, I., Herschman, H.R.: Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids doi:10.1016/j.plefa.2008.08.001
35. Jabbour, H.N., Kelly, R.W., Boddy, S.C.: Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids 67, 357-363 (2002)
36. Routledge, E.J., Sumpter, J.P.: Environ. Toxicol. Chem. 15, 241-248 (1995)
37. Sohoni, P., Sumpter, J.P.: J. Endocrinol. 158, 327-339 (1998)
38. Siiteri, P.K., Thompson, E.A.: J. Steroid Biochem. 6, 317-322 (1975)
39. Purohit, A., Ghilchik, M.W., Leese, M.P., Potter, B.V.L., Reed, M.J.: J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 94, 167-172 (2005)
40. Raobaikady, B., Parsons, M.F.C., Reed, M.J., Purohit, A.: J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 94, 123-130 (2006)

#### Egyéb felhasznált irodalom

Ádám, V., Dux, L., Faragó, A., Fésüs, L., Machovich, R., Mandl, J., Sümegi, B.: Orvosi biokémia – Medicina Könyvkiadó Rt., Budapest (2004)

[Érkezett: 2009. március 2.]



Biztonságos gyógyszerek,  
hatékony gyógyszerellátás

## BUDAPEST, 2009. NOVEMBER 13–15. BUDAPEST KONGRESSZUSI KÖZPONT A KONGRESSZUS TERVEZETT PROGRAMJA

A plenáris és szekció előadásokat a hazai és nemzetközi tudományos élet, a gyógyszeripar és a gyógyszerértékesítési gyakorlat neves szakemberei tartják. Az idei Kongresszus kiemelten kíván foglalkozni a gyógyszerbiztonsággal: az előrejelzést és a pontosságot javító kutatásokkal és fejlesztésekkel. Az interaktív gyakorlatorientált konzultációs tréningek a gyakorlati munkában közvetlenül felhasználható ismeretek gyors megszerzésére nyújtanak lehetőséget. A Kongresszuson poszterelőadások bemutatásával is részt lehet venni.

### TOVÁBBKÉPZÉSI PONTOK

A *Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XIV*-en való regisztrált részvételért a Kongresszus Szervező Bizottsága az érvényben lévő rendelet alapján 25 pontot igazol. A konzultációs tréningeken történő részvétellel további pontok szerezhetők. Napijegyhez a pontok száma időarányos.

#### A KONGRESSZUS RÉSZVÉTELI DÍJA

2009. június 30-ig történő jelentkezéssel 48.000 Ft/fő  
2009. június 30. után 58.000 Ft/fő  
helyszíni regisztráció 65.000 Ft/fő  
napijegy (esti programok nélkül) 30.000 Ft/fő  
kísérőjegy regisztráció mellé a két esti programra 20.000 Ft/fő

#### A RÉSZVÉTELI DÍJ TARTALMAZZA

- a részvétel díját és a kongresszus kiadványait
- a szünetek alatt történő kávé- és üdítőfogyasztást
- a hideg ebédet november 12-én és 13-án
- hangversenyen való részvételt november 12-én este
- gálaesten való részvételt november 13-án este

Jelentkezési határidő: 2009. szeptember 30.

### A KONGRESSZUS ELNÖKE

Prof. Dr. Klebovich Imre

### A KONGRESSZUS FŐTITKÁRA

dr. Márkus Sarolta



### TUDOMÁNYOS BIZOTTSÁG ELNÖKE

Prof. dr. Botz Lajos

### TAGOK:

dr. Bozsik Erzsébet a Gyógyszeripari Szervezet elnöke, dr. Higysán Ilona a Kórházi Gyógyszerészeti Szervezet elnöke, dr. Soós Gyöngyvér a Farmakoterápiás és Gyógyszerészeti Gondozási Szakosztály elnöke, prof. dr. Hohmann Judit a Gyógynövény Szakosztály elnöke, Vitányiné dr. Morvai Magdolna a Gyógyszeranalitikai Szakosztály elnöke, dr. Ferentzi Mónika a Gyógyszerésztörténeti Szakosztály elnöke, prof. dr. Falkay György a Gyógyszerkutatási Szakosztály elnöke, dr. Antal István a Gyógyszertechnológiai Szakosztály elnöke, a Gyógyszerügyi Szervezési és Közigazgatási Szakosztály elnöke, prof. dr. Tekes Kornélia az Oktatási Szakosztály elnöke

### SZERVEZŐ BIZOTTSÁG

Elnök:

dr. Erdei Ottilia

Tagok:

dr. Bozsik Erzsébet, Konrádné Abay-Nemes Éva, Kovácsné dr. Balogh Judit, dr. Kovácsné dr. Bácskay Ildikó, Pannonhalminé dr. Csóka Ildikó, dr. Télessy István, Vikár Katalin

### PR BIZOTTSÁG

dr. Erdei Ottilia, Pannonhalminé dr. Csóka Ildikó

### A *Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XIV.* titkársága

Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság, 1085 Budapest, Gyulai Pál u. 16.; Telefon: 338-0416, • Fax: 483-1465 • E-mail: [meeting@mgyt.hu](mailto:meeting@mgyt.hu)

A jelentkezési lapot az első értesítővel a Magyar Gyógyszerésztudományi Társaság valamennyi tagjának megküldtük



## Az *Euphrasia rostkoviana* Hayne fenoloid tartalmú frakcióinak antioxidáns értékelése

\*BLAZICS BALÁZS, ALBERTI ÁGNES, KÉRY ÁGNES

Semmelweis Egyetem, Farmakognózia Intézet, Budapest, Üllői u. 26. – 1085

\*Levelező szerző, e-mail: blazics@gmail.com

### Summary

Blazics, B., Alberti, Á., Kéry, Á.: **Antioxidant activity of different phenolic fractions separated from *Euphrasia rostkoviana* Hayne**

*Euphrasia rostkoviana* Hayne (Eyebright) is a valuable part of the traditional folk medicine as an anti-inflammatory herb since centuries. Since oxidative stress may underlie as a key feature of inflammatory process, the methanolic extract of *Euphrasia rostkoviana* Hayne (eyebright) and its methanolic fractions were evaluated for antioxidant activity by the use of ABTS and DPPH decolorization assays. Fractionation of the Soxhlet extract was accomplished by polyamide column chromatography. For chemical characterisation HPLC-DAD-MS/MS was used. Fraction 1., dominated by a glycosylated caffeic acid derivative, exhibited the strongest antioxidant activity in DPPH and ABTS assays, IC<sub>50</sub>: 11.88 µg/ml and 4.24 µg/ml, respectively, which are notable results if compared to the investigated standards. Fractions of flavonoid glycosides proved to have similarly strong, but lower effect. The scavenging reaction of the two radical cations were comparable, IC<sub>50</sub> results were differing, while precision not.

### Összefoglalás

Az *Euphrasia rostkoviana* Hayne (szemvidítófű) a népgyógyászatban évszázadok óta ismert gyulladáscsökkentő hatású gyógynövény. Mivel a gyulladásos folyamatokban a szabadgyökök kiemelkedő szerepet játszanak, vizsgáltuk a drog (*Euphrasiae herba*) metanolos kivonatának, valamint a poliamid oszlopkromatográfiával előállított frakcióinak antioxidáns hatását ABTS és DPPH szabadgyököket alkalmazó spektrofotometriás módszerekkel. A frakciók kvalitatív analízisére nagyhatékonyságú folyadékkromatográfiával kapcsolt, UV detektálással támogatott, tandem tömegspektrometriai (LC-DAD-MS/MS) módszert alkalmaztunk. Legerősebb szabadgyökfogó képességgel mindkét rendszerben (DPPH: IC<sub>50</sub>: 11,88 µg/ml, ABTS: 4,24 µg/ml) az 1. frakció rendelkezett, melynek főkomponensét egy glikozidált kávéssavszármazékként azonosítottuk. A flavonoid tartalmú frakciók szintén jelentős, bár gyengébb antioxidáns hatást mutattak. A két különböző szabadgyök scavenger viselkedése összemérhető volt, a két módszer IC<sub>50</sub> értékei szignifikánsan különböztek, míg szórásuk nem.

### 1. Bevezetés

A Scrophulariaceae családba tartozó *Euphrasia rostkoviana* Hayne, szemvidítófű, számos, különböző eredetű, gyakran gyulladásos szembetegség (konjunktivitisz, katarakta, blefaritisz, fáradt szem, vörös szem stb.) népszerű fitoterapeutikum [1, 2]. Bár a szemvidítófűvel kapcsolatos első feljegyzések 1329-ből származnak és azóta is folyamatosan elismert gyógynövényként tartják számon, hatóanyagaival és hatásmechanizmusával kapcsolatban kevés irodalmi adat lelhető fel.

Egy kilenc éve végzett nemzetközi kohorsz vizsgálat keretében számos betegen vizsgálták egy szemvidítófű-kivonatot tartalmazó, a szemén lokálisan alkalmazandó homeopátiás készítmény konjunktivitisz ellen kifejtett hatékonyságát [3]. A kivonatot a vizsgált betegek 95%-ának tüneteit enyhítette vagy szüntette meg. Az *Euphrasiae herba* (virágos hajtás) jelentősebb tartalomanyagai az iridoidok

(aokubin, eufrozid), egyszerű fenolsavak, valamint fenilpropán- és flavonoid glikozidok. További, kisebb mennyiségben jelenlevő tartalmi anyagok a keserűanyagok és a fitoszterolok ( $\beta$ -szitoszterol) [4-10].

A fenoloid vegyületek jelentős szabadgyökfogó képességüknél fogva fontos, preventív szerepet játszhatnak számos degeneratív kórképben a szövetek oxidatív stressztől való védelmével. Antioxidáns hatásuk redox tulajdonságaikkal magyarázható, redukálószerként és hidrogendonorként képesek viselkedni [11, 12].

Mivel számos természetes eredetű gyulladáscsökkentő hatású molekula egyben antioxidáns hatással is bír, logikus volt a feltevés, hogy a szemvidítófű gyulladáscsökkentő hatása részben antioxidáns vegyületeivel magyarázható [13-17].

A fentiek alapján munkánk célja az *Euphrasiae herba* metanolos összkivonat, és frakciói antioxidáns hatásának vizsgálata, valamint a kémiai összetétel és hatás közötti összefüggés feltárása volt.

## 2. Anyagok és módszerek

### Növény minta

Az *Euphrasia rostkoviana* Hayne növénymintát Romániában (Mures megye) virágzáskor gyűjtöttük 2006 júliusában. A mintákat a Semmelweis Egyetem Farmakognózia Intézetében azonosítottuk, száraz levegőn tömegállandóságig szárítottuk, majd őrléssel aprítottuk.

### Kivonás és frakcionálás

Az összkivonatot Soxhlet készülékben 15 g drogfelhasználásával, metanollal készítettük a vonatkozó európai gyógyszerkönyvi előírásoknak megfelelően. A szűrt, majd csökkentett nyomáson bepárolt kivonatot (3,1 g) 5 ml metanolban oldottuk, és elegendő mennyiségű (3-5 g) poliamidra (MN poliamid Sc-9, ICN Biomedicals) szárítottuk. Az így előállított mintát poliamid állófázissal töltött oszlop tetejére rétegeztük (magasság: 385 mm, átmérő: 30 mm), majd vízzel (1000 ml) és vizes metanollal (100 ml 50% metanol, 100 ml 75% metanol és 800 ml 100% metanol) eluáltuk. A 10 ml-es frakciókat vékonyréteg-kromatográfiás (Merck, Kieselgel GF-254, 0,2 mm) módszerrel szkríneltük [18] és a hasonló összetétellel rendelkezőket egyesítettük.

### LC-DAD-MS/MS körülmények

Az LC-MS/MS analízishez Agilent 6410 hármas kvadrupol tandem tömegspektrométerrel kapcsolt Agilent 1100 HPLC rendszert használtunk elektroporlasztásos ionizációval (ESI). A mintákat Supelco ODS Hypersil (5 µm 150 x 4,6 mm) HPLC oszlopon választottuk el, melyet ugyanazon töltettel rendelkező előtétoszloppal szereltünk. Eluensek:

- A: 2,5% ecetsavas víz (bideszt víz, Millipore Q-5 víztisztító készülék),
- B: metanol (HPLC super gradient grade, Sigma-Aldrich).

Grádiens elúciót alkalmaztunk 1 ml/perc-es áramlás mellett: 0. perc 25 % B; 25. perc 52 % B; 30. perc 90 % B; 33. perc 25% B. Az UV-spektrumokat 200-400 nm között vettük fel, az UV kromatogramok rögzítése 340 nm-es hullámhosszon történt. Az oszloptermosztát hőmérséklete: 25 °C volt.

A scan tömegspektrumokat negatív ionizációs üzemmódban vettük fel 50-700 m/z tartományban. ESI beállítások: hőmérséklet: 350 °C, nebulizer nyomás: 45 psi, szárító gáz sebesség: 9 l/perc, kapillá-

ris feszültség: 4000 V, fragmentor feszültség: 120 V. Az ionizáció elősegítése érdekében az ionforrás előtt áramlásmegosztót iktattunk a rendszerbe (60% – 40%, kuka – MS). Az ütközési cellafeszültség értékét a szerkezeti eltérések alapján 8 és 45 eV között változtattuk.

### Antioxidáns vizsgálati módszer

A minták szabadgyökfogó képességét 2,2 -azinobis 3-etilbenzotiazolin-6-szulfonsav (ABTS •<sup>+</sup>) (Fluka) és 1,1-difenil-2-pikrilhidrazil (DPPH •) (Sigma-Aldrich) szabadgyököket alkalmazó spektrofotometriás módszerekkel határoztuk meg *Re* és *mtsai* módszere alapján, kisebb módosításokat eszközölve [19]. 20 µl mintát 5 különböző koncentrációban, három párhuzamosban adtunk hozzá a szabadgyököt tartalmazó 2,5 ml oldathoz. Gyors keverést követően az abszorbancia-értékeket 30, 40, 50, 60, 90, 120, 150, 180, 210, 240, 300 és 360 másodperc elteltével jegyeztük fel. A gátlási % meghatározásához a t = 360 másodperchez tartozó, mint végső abszorbanciaértéket vettük alapul. Referenciaanyagokként aszkorbinsavat, galluszsavat, kávéssavat, klorogénsavat, rutint, kvercetin, kempferolt és troloxot (Sigma-Aldrich) használtunk és mértünk meg a mintákkal egyező körülmények közt. A gátlási %-ot a blank és a végső (t = 360 sec) abszorbanciák segítségével az alábbi képlettel számoltuk:

$$\text{Gátlási \%} = (A_b - A_v) / A_v \times 100$$

ahol

$A_b$  = blank abszorbancia (t = 0 sec);

$A_v$  = végső abszorbancia.

A gátlási %-ot a koncentráció függvényében ábrázolva határoztuk meg az  $IC_{50}$  (az antioxidáns azon koncentrációja, mely a kezdeti szabadgyök koncentrációjának 50%-os csökkentéséhez szükséges) értékeket. A mérésekhez HITACHI U-2000 spektrofotométert használtunk.

Az ABTS törzsoldat elkészítéséhez 10 mg ABTS-t 2,6 ml HPLC tisztaságú vízben oldottunk, szabadgyök képzéshez (ABTS •<sup>+</sup>) 1,72 mg kálium-per-szulfátot adtunk hozzá, majd a reakcióelegyet sötétben, szobahőmérsékleten 14-16 órán át állni hagytuk. Mérés előtt az oldatot spektroszkópiai tisztaságú etanollal (Reanal) úgy hígítottuk, hogy a 734 nm-en mért abszorbanciája  $0,900 \pm 0,05$  legyen. A DPPH törzsoldathoz 10 mg DPPH-t 25,0 ml

HPLC tisztaságú metanolban (Carlo Erba) oldotunk, majd metanollal úgy hígítottuk, hogy abszorbanciája 515 nm-en  $0,900 \pm 0,05$  legyen [20].

#### Statisztikai értékelés

Minden mérést három párhuzamosban végeztünk, majd az adatokból átlagot számoltunk. Az adatokat  $P < 0,05$  szignifikanciaszinten vizsgáltuk. Az adatokat átlagértékkel és standard deviációval (SD) adtuk meg. A mérési eredmények összehasonlítására student t és F próbát alkalmaztunk

### 3. Eredmények és megvitatás

#### Mintakomponensek azonosítása

A vizsgált komponenseket negatív ionizációs üzemmódban alacsony alapvonal mellett jó érzékenységgel detektáltuk, ionforrás-fragmentációt az alkalmazott fragmentációs feszültség mellett még glikozidok esetében sem tapasztaltunk. A frakciók összetétele kismértékű átfedésektől eltekintve jelentősen különbözött. Az LC-MS/MS vizsgálati eredmények szerint az 1-2. frakciók egy glikozilált fenilpropán származékokra ( $m/z$ : 623) nézve gyakorlatilag monokomponensűek voltak, az 1. frakció ezt a komponenst több mint 90%-os tisztaságban tartalmazta. A 3. frakció változatosabb összetételű volt, ebben két flavonoid glikozidot (kvercetin-rutinozid,  $m/z$  609 és kempferol-rutinozid  $m/z$  593),

valamint kis mennyiségben az 1-2. frakciókra dominánsan jellemző fenilpropán-származékot ( $m/z$  623) azonosítottunk. A további, 4-6 frakciók túlnyomó részt flavonoid glikozidokat tartalmaztak, luteolin- ( $m/z$  447), kempferol- ( $m/z$  447) és apigenin ( $m/z$  431) aglikonok monohexoz glikozidjait azonosítottuk, valamint kvercetin-rutinozid ( $m/z$  609), kempferol-rutinozid ( $m/z$  593) és rhamnetin-hexozid ( $m/z$  477) jelenlétét is igazoltuk. A flavonoidok, mint főkomponensek mellett minor komponensként kávéssav ( $m/z$  179) és kumársav ( $m/z$  163) jelenlétét mutattuk ki. A 7. frakció jellemző alkotói kvercetin-hexozid ( $m/z$  463) és kávéssav-származék ( $m/z$  367) voltak. Az utolsó, 8. frakció kizárólag kávéssav származékokat ( $m/z$  367, és  $m/z$  337) valamint klorogénsavat ( $m/z$  353) tartalmazott. Az azonosságot referencia anyagok retenció, UV spektrális és tandem tömegspektrometriás fragmentációs adataival való egyezés alapján, valamint irodalmi adatokra támaszkodva jelentettük ki [21].

#### Antioxidáns hatás

Számos korlátjuk ellenére, egyszerűségüknek, gyorsaságuknak és minimális eszközigényüknek köszönhetően az ABTS és DPPH szabadgyököket alkalmazó spektrofotometriás módszerek széles körben elterjedtek különböző eredetű és összetételű minták antioxidáns hatásának gyorsvizsgálatára [22, 23]. Az *Euphrasiae herba* mindegyik metanolos frakciója koncentrációfüggő szabadgyökfogó hatást

I. táblázat

Az *Euphrasia rostkoviana* Hayne metanolos frakcióinak és a referencia anyagok antioxidáns hatása.  
( $IC_{50}$  átlag  $\pm$  standard deviáció)

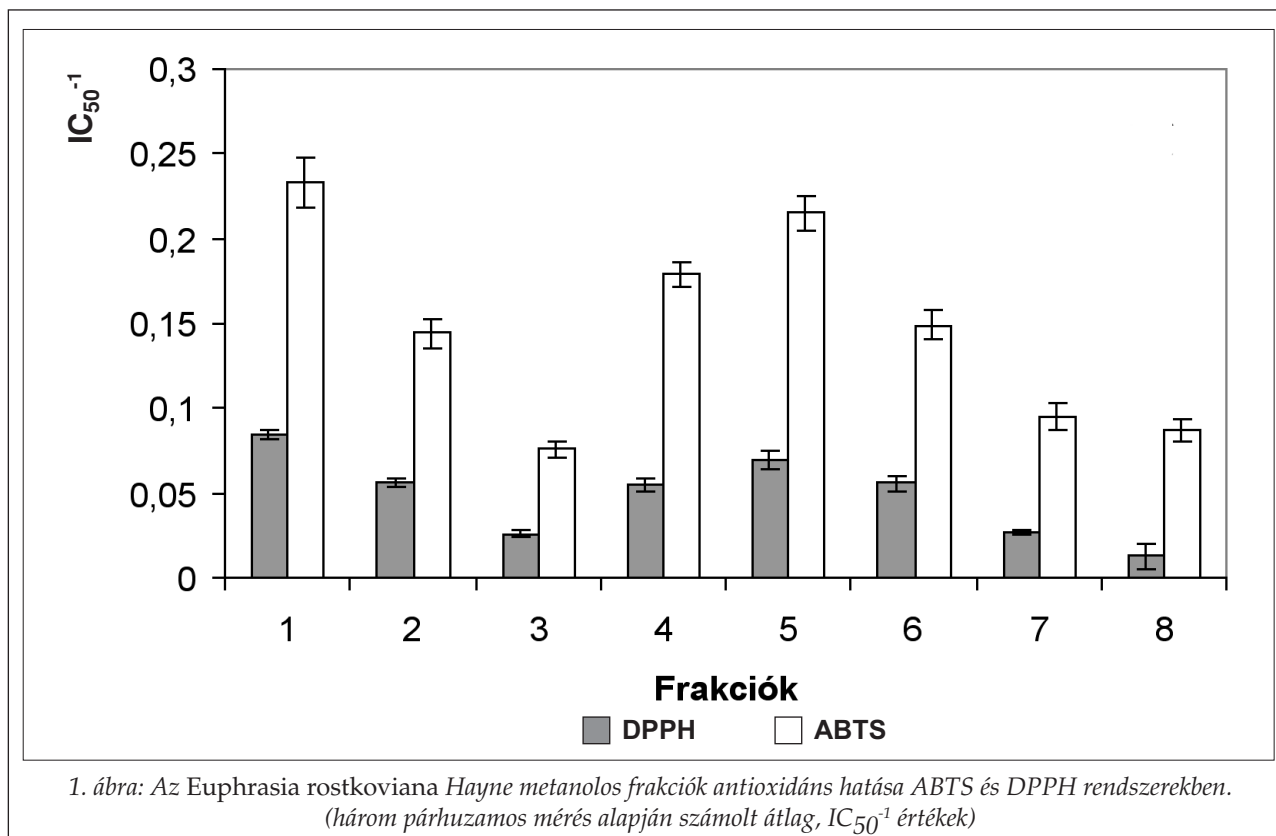
Frakció	$IC_{50}$ ( $\mu g/ml$ ) $\pm$ SD		Referencia	$IC_{50}$ ( $\mu g/ml$ ) $\pm$ SD	
	DPPH	ABTS		ABTS	DPPH
1.	4,24 $\pm$ 0,18	11,88 $\pm$ 0,39	Aszkorbinsav	4,74 $\pm$ 0,15	4,78 $\pm$ 0,19
2.	6,92 $\pm$ 0,42	17,88 $\pm$ 0,96	Kávéssav	1,93 $\pm$ 0,12	5,05 $\pm$ 0,20
3.	13,15 $\pm$ 0,87	37,70 $\pm$ 2,54	Klorogénsav	4,72 $\pm$ 0,17	7,43 $\pm$ 0,32
4.	5,56 $\pm$ 0,24	17,93 $\pm$ 1,37	Galluszsav	0,89 $\pm$ 0,52	2,64 $\pm$ 0,16
5.	4,63 $\pm$ 0,22	14,31 $\pm$ 1,18	Kempferol	8,37 $\pm$ 0,22	18,86 $\pm$ 0,67
6.	6,71 $\pm$ 0,40	17,72 $\pm$ 1,40	Kvercetin	1,21 $\pm$ 0,06	3,48 $\pm$ 0,19
7.	10,55 $\pm$ 0,94	36,33 $\pm$ 1,62	Rutin	3,27 $\pm$ 0,11	7,36 $\pm$ 0,26
8.	11,42 $\pm$ 0,82	74,53 $\pm$ 4,27	Trolox	2,07 $\pm$ 0,09	5,32 $\pm$ 0,22
Összkivonat	17,46 $\pm$ 0,88	34,78 $\pm$ 1,93			

fejtett ki mindkét vizsgálati rendszerben. Az ABTS módszer esetében a szakirodalom az eredményeket „TEAC” [trolox ekvivalens antioxidáns kapacitás; az a troloxmennyiség (mM), mely 1 mM mennyiségű vizsgálati mintával megegyező antioxidáns aktivitást fejt ki] értékben adja meg. Mivel az *Euphrasia* frakciók multikomponensűek voltak és az összetevők arányát nem ismertük, nem volt kizárólagos móltömeg, mely megfeleltethető lett volna adott frakcióval, ezért a TEAC rendszerű értékelés nem volt lehetséges.

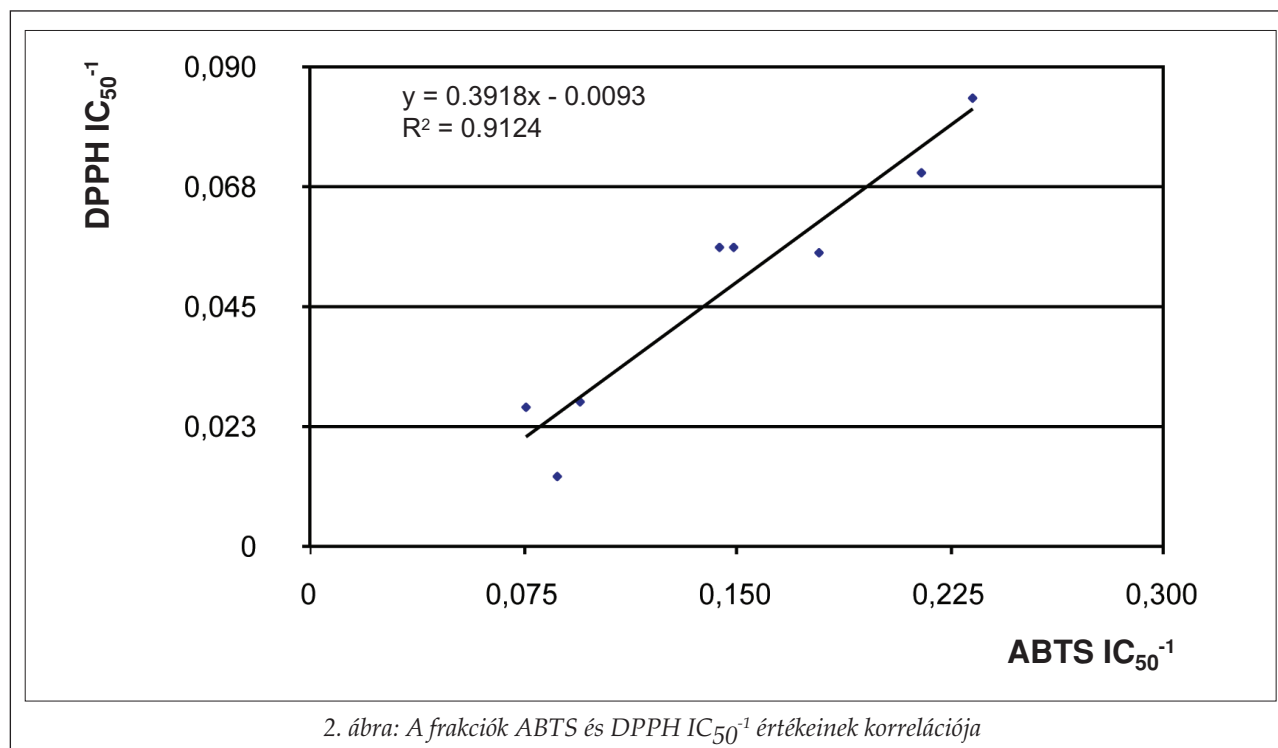
A referencia anyagok közül a galluszsav mutatott legerősebb antioxidáns hatást az alkalmazott rendszerekben. A galluszsav -OH szubsztituenseinek száma, azok egymáshoz való közelsége, ill. induktív effektusuk magyarázatot adhatnak a molekula erős szabadgyökfogó képességére [24]. A flavonoid standardokkal kapott eredményeink alátámasztják az ismert szerkezet-hatás összefüggéseket, miszerint a szabadgyökfogó képesség az -OH szubsztituensek számának, glikoziláltságának, és pozíciójának függvénye [25-28]. A szabad -OH csoportok magasabb száma erősebb antioxidáns hatást eredményez (kvercetin vs. kempferol és kvercetin vs. rutin, I. táblázat).

Bár az összkivonat közepes antioxidáns hatást mutatott, annak érdekében, hogy összetevőinek ak-

tivitásáról külön-külön is képet alkothassunk, poliamid oszlopon frakcionáltuk. Legerősebb hatással az 1. frakció emelkedett ki, az  $IC_{50}$  átlagértékek a következők: 11,88  $\mu\text{g/ml}$  (DPPH) és 4,24  $\mu\text{g/ml}$  (ABTS). A második legjelentősebb hatást az 5. frakció esetében tapasztaltuk,  $IC_{50}$ : 17,88  $\mu\text{g/ml}$  (DPPH) és 6,92  $\mu\text{g/ml}$  (ABTS) (I. táblázat). A kvercetin standard  $IC_{50}$  értéke 4,1-szer (DPPH) és 3,8-szor (ABTS) volt alacsonyabb, mint a legalacsonyabb  $IC_{50}$  értékkel jellemezhető flavonoid tartalmú frakció (5. frakció), ugyanakkor a kvercetin glikozid standard (rutin)  $IC_{50}$  értéke jóval közelebb állt az 5. frakció  $IC_{50}$  értékéhez. A frakciókban azonosított flavonoidok O-glikozidok, amelyek a fent leírtak szerint egyértelműen alacsonyabb antioxidáns hatással bírnak, mint a megfelelő aglikonok. A kávésav referencia anyag a legkiemelkedőbb, kávésavszármazék-tartalmú 1. frakciónál 2,3-szor (DPPH) ill. 2,2-szer (ABTS) erősebb szabadgyökfogónak bizonyult. A tömegspektrometriai analízis során, az 1. frakció főkomponensében detektált hexóz cukorkomponens részben magyarázatot adhat erre a különbségre. Hasonlóan voltak jellemezhetőek a flavonoidok is; átlagosan kétszeres különbség mutatkozott a legerősebb flavonoid tartalmú 5. frakció és a rutin standard között. Az 1. ábra oszlopdiagramjának  $IC_{50}^{-1}$  értékei az LC-MS/MS







eredményekkel együtt durva áttekintést adnak a poliamid oszlop retenciós tulajdonságairól. A vízoldékony glikozilált fenilpropán egységek eluálódnak legelőször, amit flavonoid glikozidok, többségében rutin és kis mennyiségben néhány kávésszármazék, végül a cukor komponenseket nem tartalmazó egyszerű fenoloidok követnek. A DPPH és ABTS rendszerek  $IC_{50}$  értékei jó korrelációt mutatnak ( $r^2 = 0,9124$ ) (2. ábra). A DPPH  $IC_{50}$  értékek szignifikánsan különböztek az ABTS megfelelő adataitól, míg a két módszer precizitása (standard deviáció) nem volt különböző. A két módszerrel kapott eredmények jól összehasonlíthatók, a két módszer együttes alkalmazása célszerű. Érdekes, hogy az ABTS szabadgyökökkel szemben átlagosan 2,8-szor hatékonyabb szabadgyökfogónak bizonyult minden frakció, mint a DPPH-val szemben. Érdeemes megemlíteni, hogy a DPPH szabadgyök törzsoldata a maga 7 napos stabilitásával 3,5-szer stabilabb volt, mint az ABTS törzsoldat.

#### 4. Összegzés

Irodalomkutatásunk szerint jelen munka az első, mely DPPH és ABTS szabadgyököket alkalmazó *in vitro* módszerekkel vizsgálja az *Euphrasia rostkoviana* Hayne fenoloid komponenseit. Korábban *Petrichenko* munkacsoportja volt az egyetlen, akik *Euphrasia* minták antioxidáns hatását tanulmányozták, lanolin autooxidációs módszerrel [29]. Eredménye-

ink szerint a metanolos *Euphrasia* frakciók erős, koncentrációfüggő antioxidáns hatást mutattak a bemutatott vizsgálati rendszerekben. Legpotensebbnek a fenilpropán származékokban ill. rutinban dús frakciók bizonyultak. A növényi kivonatokban együttesen jelenlévő számos hatóanyag additív és szinergista hatása erősít(het)i annak antioxidáns aktivitását [30], ezért a számos komponenst tartalmazó szemvidítófű kivonat tradicionálisan ismert gyulladáscsökkentő hatására részben magyarázatot adhat tartalomanyagainak antioxidáns tulajdonsága. Az ABTS és DPPH gyorsmódszerek eredményeinek interpretálása nem egyszerű és nehezen alkalmazható szélesebb kontextusban, mivel ezen módszerek eredményei néha egymással is ellentétben állnak [23, 24]. Mindenesetre adott mintát legalább két különböző módszerrel vizsgálva közelítő képet mindenképp kapunk, mely akár további, részletes vizsgálatokhoz szolgálhat irányadóként.

#### IRODALOM

1. Duke, J. A. Eyebright. Handbook of Medicinal Herbs CRC Press, Boca Raton, FL 1985. 172-174. old
2. Bisset, G. N. Herbal drugs and phytopharmaceuticals. CRC Press, medpharm Scientific Publishers Stuttgart 1994. 195. old
3. Stoss, M., Michels, C., Peter, E., Beutke, R., Gorter, R.W.: J. Altern. Comp. Med. 6, 499-508. (2000)

4. Blaschek, W., Hänsel, R., Keller, K., Reichling, J., Rimpler, H., Schneider, G.: Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis. Folgewerk, Springer, 1998. 666-672. old.
5. Matlawska, I., Sikorska, M., Kowalewski, Z.: *Herba Polonica* 31, 119-123. (1985)
6. Matlawska, I., Sikorska, M., Kowalewski, Z.: *Herba Polonica* 34, 97-102. (1988)
7. Harkiss, K. J., Timmins, P.: *Planta Medica* 23, 342-347. (1973)
8. Sticher, O., Salama, O.: *Planta Medica* 42, 122-123. (1981)
9. Sticher, O., Salama, O.: *Planta Medica* 42, 123-124. (1981)
10. Salama, O., Sticher, O.: *Planta Medica* 47, 90-94. (1983)
11. Catherine, A., Rice-Evans, C., Nicholas, J. M., George, P.: *Free Rad. Biol. Med.* 20, 933-956. (1996)
12. Rice-Evans, C., Miller, N. J., Bolwell, G. P., Bramley, P. M., Pridham, J. B.: *Free Rad. Res.* 22, 375-383. (1995)
13. Chamundeeswari, D., Vasantha, J., Gopalakrishnan, S., Sukumar, E.: *J. Ethnopharmacol.* 88, 51-56. (2003)
14. Lo, A. H., Liang, Y. C., Lin-Shiau, S. Y., Ho, C. T., Lin, J. K.: *Carcinogenesis* 23, 983-991. (2002)
15. Wu, M. J., Yen, J. H., Wang, L., Weng, C. Y.: *Am. J. Chin. Med.* 32, 681-693. (2002)
16. Scalbert, A., Johnson, I. T., Saltmarsh, M.: *Am. J. Clin. Nutr.* 81, 215-217 (2005)
17. Vinson, J. A., Jang, J., Dabbagh, Y. A., Serry, M. M., Cai, S.: *J. Agric. Food. Chem.* 43, 2798-2799. (2005)
18. Wagner, H., Bladt, S.: *Plant drug analysis*, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg 1996. 210. old.
19. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C.: *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1231-1237. (1999)
20. Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C.: *Lebensm. Wiss. Technol.* 28, 25-30. (1995)
21. Blazics, B., Ludany, K., Szarka, Sz., Kery, A.: *Chromatographia* 68, S119-S124. (2008)
22. Prior, R. L., Wu, X., Schaich, K.: *J. Agric. Food Chem.* 53, 4290-4302. (2005)
23. Frankel, E. N., Meyer, A. S.: *J. Sci. Food Agr.* 80, 1925-1941. (2000)
24. Sanchez-Moreno, C., Larrauri, J. A., Saura-Calixto, F.: *J. Sci. Food Agr.* 76, 270-276. (1998)
25. Okawa, M., Kinjo, J., Nohara, T., Ono, M.: *Biol. Pharm. Bull.* 24, 1202-1205. (2001)
26. Pyo, Y. H., Leeb, T. C., Logendra, L., Rosen, R. T.: *Food chemistry* 85, 19-26. (2004)
27. Burda, S., Oleszek, W.: *J. Agric. Food. Chem.* 49, 2774-2779. (2001)
28. Kim, D. O., Lee, C. Y.: *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 44, 253-273. (2004)
29. Petrchenko, V. M., Sukhinina, T. V., Babiyan, L. K., Shramm, N. I.: *Pharm. Chem. Journal* 40, 22-26. (2006)
30. Liu, R. H.: *Am. J. Clin. Nutr.* 78, 517S-520S. (2003)

[Érkezett: 2009. március 13.]

## DockingServer: molekuláris dokkolási számítások a böngészőben

HAZAI ESZTER, KOVÁCS SÁNDOR, DEMKÓ LÁSZLÓ, \*BIKÁDI ZSOLT

Virtua Drug Kft., Csalogány utca 4c, Budapest H-1015

\*Levelező szerző: e-mail: zsolt.bikadi@virtuadrug.com

### Summary

Hazai, E., Kovács, S., Demkó, L. Bikádi, Zs.: **DockingServer: Molecular docking calculations online**

Over the last years, the use of bioinformatics tools such as molecular docking has become an essential part of research focused at prediction of the binding of small molecules to their target proteins. DockingServer offers a web-based, easy to use interface that handles all aspects of molecular docking from ligand and protein set-up through results representation integrating a number of software frequently used in computational chemistry. While its user friendly interface enables docking calculation and results evaluation carried out by researchers coming from all fields of biochemistry, DockingServer also provides full control on the setting of specific parameters of ligand and protein set up and docking calculations for more advanced users. The application can be used for docking and analysis of single ligands as well as for high throughput docking of ligand libraries to target proteins. The use of „DockingServer” is illustrated by the formation of acetaminophene (paracetamol) – CYP2E1 complex.

Availability: DockingServer is accessible as a public web service at <http://www.dockingserver.com>

### Összefoglalás

Az elmúlt évtizedben a molekuláris dokkolás alapvető módszerre vált olyan kutatási területeken (pl. virtuális szűrés, szerkezet alapú gyógyszertervezés), ahol a célkitűzés kis molekulák célfehérjén való kötődésének predikciója. A „DockingServer” egy olyan komplex webes megoldás, amely a molekuláris dokkolás összes lépését kezeli, kezdve a ligandum és fehérje előkészítésével egészen az eredmények bemutatásáig, integrálva számos, a számítógépes kémiában használatos szoftvert. A felhasználóbarát felület a biokémia minden területén tevékenykedő, még a molekuláris dokkolás területén tapasztalattal nem rendelkező kutató számára is lehetővé teszi a dokkolási számítások végrehajtását és az eredmények értékelését. Ugyanakkor a nagyobb tapasztalattal rendelkező felhasználók számára teljes szabadságot biztosít a ligandum és fehérje specifikus paramétereinek beállítására és a teljes dokkolási folyamat irányítására. Alkalmazható akár egy ligandum dokkolására és elemzésére, de ligandum könyvtárak célfehérjéhez való nagy áteresztőképességű dokkolására is. A „DockingServer” használatát paracetamol és CYP2E1 komplex képződésének példáján mutatjuk be.

Hozzáférhetőség: A DockingServer a <http://www.dockingserver.com> oldalon érhető el.

### Bevezetés

A ligandumok és célfehérjék közötti kölcsönhatás elemzése alapvető fontosságú a biokémiai folyamatok egy sor szempontjának felderítésére. A ligandumok és fehérjék közötti kölcsönhatás vizsgálata során a laboratóriumi kísérleteken kívül egyre nagyobb jelentőségűek az ún. *in silico* módszerek. A ligandum-fehérje kölcsönhatás *in-silico* vizsgálata magában foglalja a molekuláris dokkolást, amely során a számítógépes kémia módszereivel megadják a ligandumok, szubsztrátok vagy lehetséges gyógyszerjelöltek kötési energiáját és geometriáját a vizsgált célfehérjékhez.

A molekuláris dokkolás során a legalacsonyabb energiájú fehérje-ligandum geometriát kívánjuk meghatározni. A problémát általánosságban egy optimalizálási feladatnak tekinthetjük, melynek so-

rán a cél két (flexibilis) molekula közötti intermolekuláris energia minimalizálása. Tekintettel arra, hogy a fehérje-ligandum komplex lehetséges geometriájának száma gyakorlatilag végtelen, különböző algoritmusokat használnak fel, hogy a számításokhoz szükséges erőforrásokat csökkentve derítsék fel a lehetséges konformációk terét. A szakirodalomban számos dokkolási módszert közöltek, melyek meghaladják jelen dolgozat kereteit. A téma iránt érdeklődő olvasó részére számos kitűnő összefoglaló áll rendelkezésre [1, 2, 3, 4].

Egy molekuláris dokkolási számítás számos előkészítő és feldolgozó lépést foglal magában:

1. A ligandum geometriájának optimalizálása, a pH-függő parciális töltések kiszámítása, a rotálható kötések meghatározása;
2. Az adott fehérje elektrosztatikus tulajdonságainak kiszámítása és a kötési régió definiálása;

3. Ezt követően a ligandum-fehérje kölcsönhatást (egy, az intermolekuláris energia feltételeit és egyenleteit leíró) szabadentalpia számítási eljárásokkal (*scoring function*-ok) számítják ki;

4. A dokkolási számítás eredménye a ligandum-fehérje komplex geometriájának és az ahhoz tartozó kötési energiának meghatározása, ezért az eredmények pontos interpretálásának és jó minőségű megjelenítésének szintén nagy a jelentősége. Az 1. ábrán mutatjuk be a dokkolási számítások folyamatábráját.

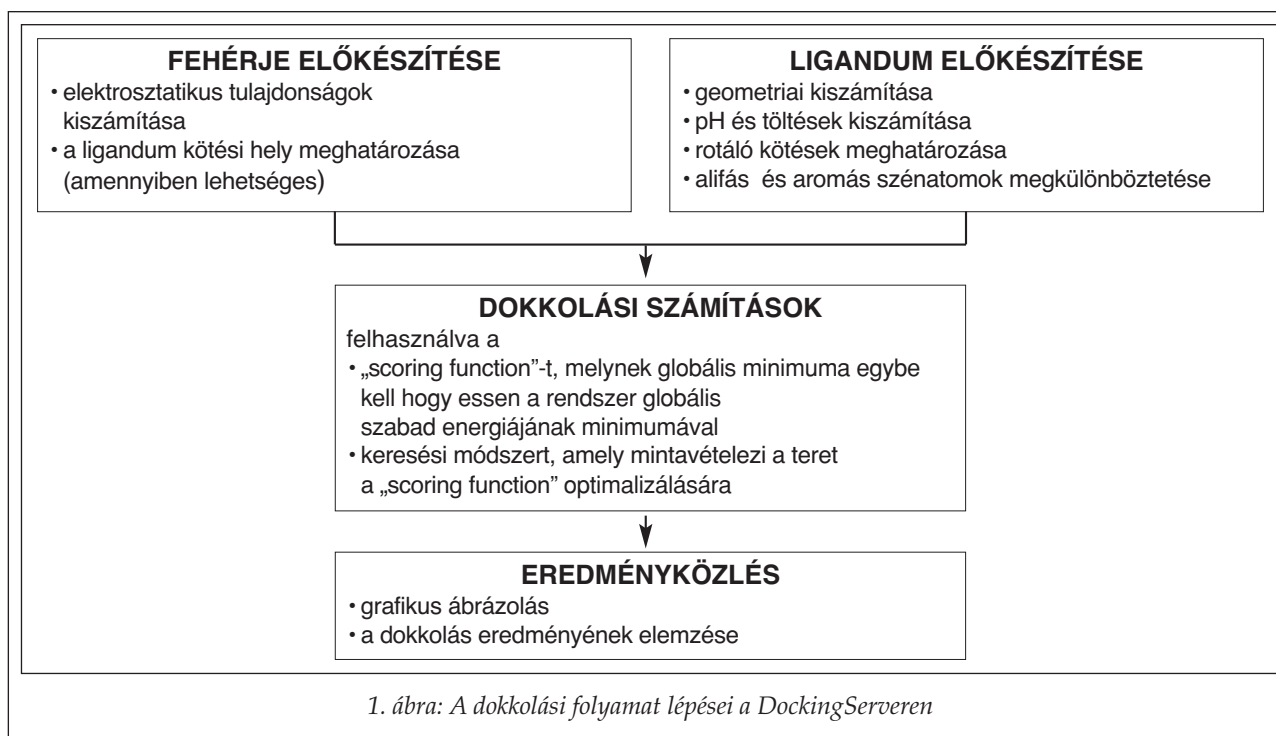
A molekuláris dokkolási számítások iránti nagy igény következménye, hogy az elmúlt néhány évben egy sor webes dokkoló szerveret hoztak létre fehérje-fehérje dokkolásra: ClusPro, GRAMM-X, ZDOCK, PatchDock és SymmDock, FireDock, RosettaDock [5, 6, 7, 8, 9, 10, 11]. Fehérje-ligandum dokkolására is hozzáférhetőek web szerverek, például a TarFisDock [12].

Jelen dolgozatban közöljük az első olyan komplex webes alkalmazást (*DockingServer*), amely a fehérje-ligandum dokkolás teljes folyamatát képes kezelni. A DockingServer számos olyan, a kémiai informatikában alkalmazott szoftvert egyesít, melyeket arra használnak, hogy a dokkolási eljáráshoz szükséges különböző lépéseket (azaz a pontos ligandum geometriájának optimalizálása, az energia minimalizálása, a töltések kiszámítása, a dokkolási számítás elvégzése, valamint ligandum-fehérje komplex meg-

jelenítése) hajtsák végre. A DockingServer alkalmazása lehetővé teszi, hogy a felhasználó olyan hatékony és robusztus dokkoló számításokat hajtsa végre, amelyeket eddig weben keresztül nem lehetett megoldani. A számítások központi szervereken futnak, így a DockingServer használata a felhasználó részéről nem kíván sem nagyigényű hardvert, sem előre telepített szoftvert.

A DockingServer webes alkalmazás magját saját PHP szoftverünk képezi, amely egy MySQL adatbázishoz csatlakozik, ahol a különböző feladatokat a szerverünkön futó „démonok” automatikusan ki- osztják, az adatbázisból a beviteli adatokat beolvassák, majd a kiviteli adatokat az adatbázisba irányítják.

Az AutoGrid/AutoDock 4.0 [13] programcsomagot alkalmazzuk a dokkolási számításokhoz, amely flexibilis ligandumokat dokkol a fehérjékhez. Az AutoDock programcsomaggal a ligandumok és fehérjék parciális töltését Gasteiger módszerével határozhatjuk meg. Mivel a dokkolási számítások pontossága nagy mértékben függ a ligandumon számított töltések pontosságától, ezért azon kívül, hogy a ligandum parciális töltésének kiszámítására az AutoDock Tools programcsomag alkalmazható, szemiempirikus kvantumkémiai módszerrel, az integrált MOPAC2007 [14] program segítségével is számíthatók a parciális töltések. A pH-függő protonálás és pontos kiszámítására a Marvin





szoftvert alkalmazzuk [15]. Ezen kívül, a geometria optimalizálása, a ligandum geometriájának finomítása is lehetséges szemiempirikus módszerekkel (PM6). A fehérje-ligandum komplex eredmények ábrázolására a Jmol (<http://jmol.sourceforge.net>) és VMD [16] programokat építettük be a DockingServer-be, így széleskörű molekula-megjelenítési lehetőségek állnak rendelkezésre. A ligandumok megjelenítésére és ábrázolására a ChemoXon „Marvin Sketch” programját használjuk.

### Leírás

A DockingServer ablakai három modulba szerveződnek, követve a dokkolási számítások alapvető lépéseit: (1) fehérje előkészítés; (2) ligandum előkészítés; (3) dokkolási számítások. A felhasználó saját ligandum, fehérje és dokkoló mappát hozhat létre, ily módon a ligandumokat, fehérjéket és dokkolásokat el lehet menteni további felhasználások céljára.

1. A fehérjét pdb fájlként lehet feltölteni, vagy (szükség esetén egy kulcsszó szerinti keresést követően) közvetlenül le lehet tölteni a „Protein Data Bank” ([www.rcsb.org](http://www.rcsb.org)) fehérje adatbázisból. Ennél a lépésnél a felhasználó eldöntheti, hogy a dokkolási számításokban figyelembe akarja-e venni a vízmolekulákat, vagy más olyan heteroatomokat, melyeket a pdb fájl tartalmaz. A pdb fájlban lévő kismolekulákat a rendszer képes automatikusan feldolgozni. A következő lépésben a szimulációs dobozt lehet meghatározni. A szimulációs dobozon vagy kiválaszthatjuk, hogy csak az ismert ligandum-kötő helyet vegye figyelembe, vagy az egész célfehérjét. Ezen kívül a DockingServer lehetővé teszi, hogy a felhasználó a szimuláció központjaként vagy határaként a röntgenszerkezetben lévő kismolekulák központját adja meg.
2. A ligandumokat egy Java ablakban rajzolhatjuk be, vagy a legnépszerűbb szerkezeti formátumokban (mol, mol2, pdb) tölthetjük fel a rendszerbe. Nem csupán egy ligandumot lehet feltölteni, sdf fájlokban több kismolekula egyidejűleg is feltölthető, lehetővé téve ezáltal ligandum könyvtárak nagy áteresztőképességű dokkolását. A felhasználó kiválaszthatja a kívánt pH-t (a pH értéke a ligandum protonálási állapotára hat), továbbá a geometria optimalizálás és parciális töltésszámítás módszerét választhatja ki.
3. A dokkolási ablakban több ligandumot és/vagy több fehérjét választhatunk a dokkolási számításokra. A dokkolási számítást a megadott kiindu-

lási paraméterekkel lehet kezdeni, de azokat a tapasztaltabb felhasználók manuálisan is beállíthatják.

Végezetül a dokkolás eredményét a DockingServer több módon foglalja össze abból a célból, hogy jobban lehessen az eredményeket értelmezni.

- A dokkolási energiákat, frekvenciákat és a letölthető pdb koordinátákat egy táblázatban foglalja össze.
- A számított ligandum-fehérje komplexeket a DockingServer a VMD alkalmazásával automatikusan ábrázolja, de az ábrázolást Jmol applet-et használva manuálisan is létre lehet hozni.
- A DockingServer automatikusan létrehoz ligandum-fehérje kölcsönhatási táblázatokat, ez segít a komplexképződés hajtóerejének felismerésében.
- HB-plot [17] készül az egész fehérje kötési hatásának interpretálására.
- Összefoglalja az alkalmazott módszereket és a vonatkozó referenciákat [13-17].

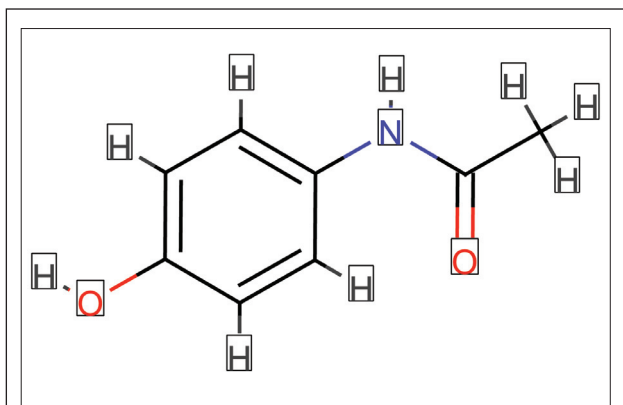
### Példa a DockingServer alkalmazására

A paracetamol (4'-hidroxi-acetanilid, acetaminophen) (ld. 2. ábra) évtizedek óta széles körben használt, vény nélkül is kapható láz- és fájdalomcsillapító. Megfelelően alkalmazva biztonságos, terápiás dózisban kevés mellékhatást mutat, azonban túladagolása az egyik leggyakoribb oka a gyógyszeres májkárosodásoknak és fulmináns májelégtelenségeknek, amelyek gyakran halálos kimenetelűek [18]. A paracetamol toxikus metabolitja, az N-acetil-p-benzokinonimin (NAPQI) a P450 enzimrendszeren keresztül keletkezik. A NAPQI képződésében bizonyítottan szerepe van a CYP1A2, a CYP2E1 és a CYP3A4 enzimeknek. Ezen enzimek közül terápiás dózisban a CYP3A4, míg túladagolás esetén a CYP2E1 és CYP1A2 enzimeknek van kitüntetett szerepe [18].

Porubsky és munkatársai 2008-ban publikálták a CYP1A2 enzim szerkezetét röntgendiffrakciós mérések alapján [19]. Az enzimszerkezet ismeretében lehetővé vált, hogy megvizsgáljuk: vajon tudjuk-e molekuláris szinten értelmezni a paracetamolnak NAPQI-vá való átalakulását. A dokkolás során a DockingServer kiindulási paramétereit alkalmaztuk (szemiempirikus töltésszámítás a ligandum atomokon, 100 futás).

A 3. ábrán mutatjuk be a paracetamol CYP2E1 enzimmel számított legalacsonyabb energiájú komplexét. Jól látható, hogy a kísérletes eredményekkel összhangban a paracetamol úgy helyezkedik el az enzim aktív centrumában, hogy sze-

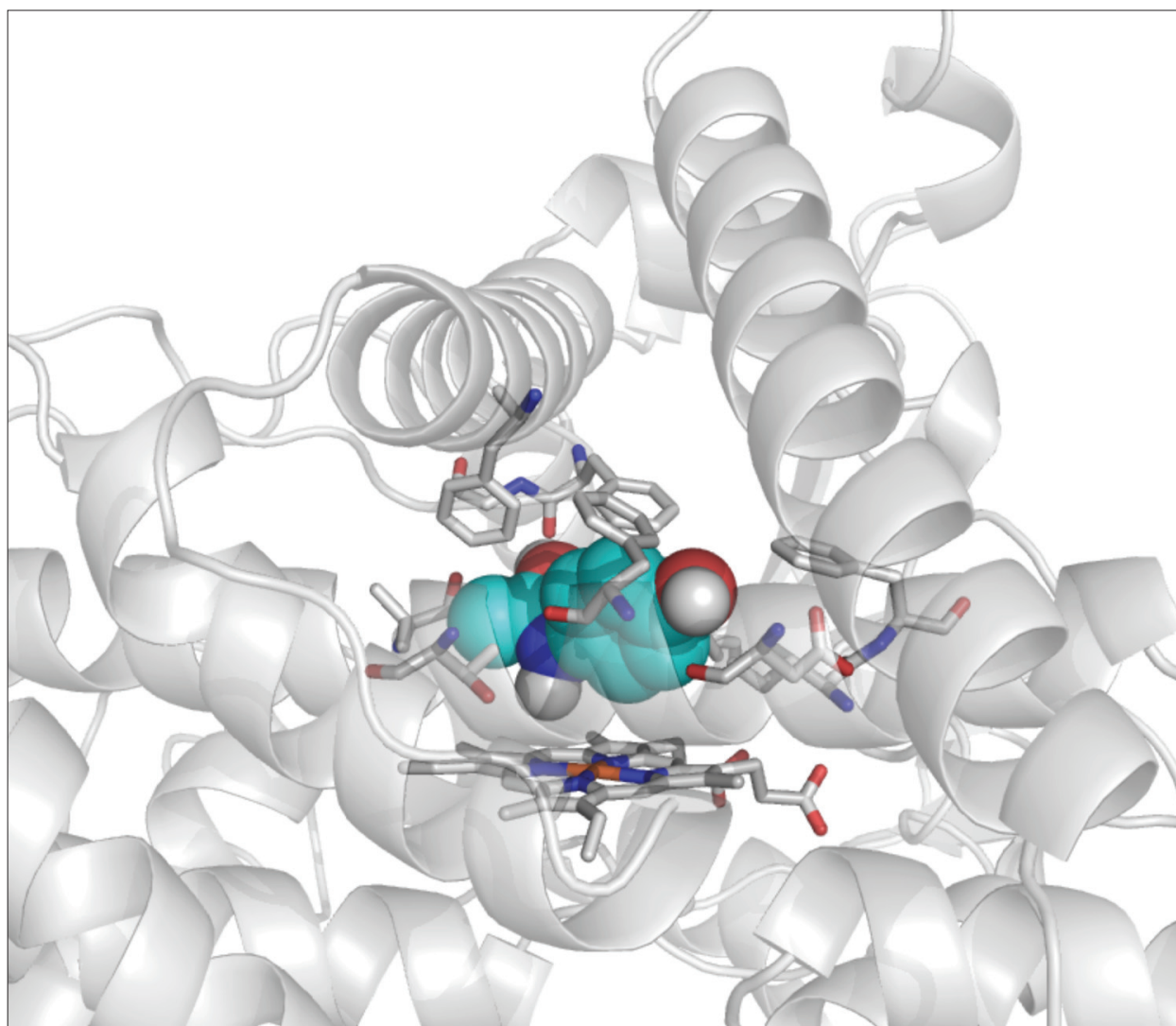
kunder aminocsoportja támadható, így lehetővé válik a NAPQI képződése. A dokkolás molekuláris szinten igazolta a kísérletben tapasztalt eredményeket.



2. ábra: A paracetamol szerkezete

### Összefoglalás

A DockingServer egy webes szolgáltatás, amely egy egyszerűen használható, felhasználóbarát grafikus felület a molekuláris dokkolások végrehajtására vagy egyetlen ligandum, vagy ligandum könyvtár alkalmazásával. A felhasználók további felhasználás céljára mappákba szervezhetik fehérjéiket, ligandumaikat és dokkolásaikat. A DockingServer egyesít egy sor kémiai informatikában használatos szoftvert, melyek a paraméterek pontos számítására irányulnak és a dokkolási eljárás különböző lépéseiben (pontos ligandum geometria optimalizálás, energia minimalizálás, töltések számítása, dokkolási számítások) alkalmazhatóak. Összefoglalva, a DockingServer egy nagy hatékonyságú és robusztus rendszer, mely számos, az *in-silico* kémiában elterjedt szoftvert egyesít és lát el további funkciókkal egyetlen átfogó webes alkalmazásban.



3. ábra: A paracetamol dokkolása a CYP2E1 enzimhez

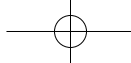
**Köszönetnyilvánítás**

A szerzők köszönetet mondanak *Dr. Hazai István*-nak értékes tanácsaiért és a kézirat gondos ellenőrzéséért.

**IRODALOM**

1. Halperin, I., Ma, B.Y., Wolfson, H., Nussinov, R.: Proteins-Structure Function and Genetics: 47, 409-443 (2002)
2. Kitchen, D.B., Decornez, H., Furr, J.R., Bajorath, J.: Nat Rev Drug Discov: 3, 935-949 (2004)
3. Sousa, S.F., Fernandes, P.A., Ramos, M.J.: Proteins-Structure Function and Bioinformatics: 65, 15-26 (2006)
4. Vaque, M., Ardrevol, A., Blade, C., Salvado, M.J., Blay, M., Fernandez-Larrea, J., Arola, L., Pujadas, G.: Curr Pharm Anal: 4, 1-19 (2008)
5. Comeau, S.R., Gatchell, D.W., Vajda, S., Camacho, C.J.: Bioinformatics: 20, 45-50 (2004)
6. Tovchigrechko, A., Vakser, I.A.: Nucl Acid Res: 34, W310-W314 (2006)
7. Chen, R., Li, L., Weng, Z.P.: Proteins-Structure Function and Genetics: 52, 80-87 (2003)
8. Schneidman-Duhovny, D., Inbar, Y., Nussinov, R., Wolfson, H.J.: Nucl Acid Res: 33, W363-W367 (2005)
9. Ritchie, D.W., Kemp, G.J.L.: Proteins-Structure Function and Genetics: 39, 178-194 (2000)
10. Mashiach, E., Schneidman-Duhovny, D., Andrusier, N., Nussinov, R., Wolfson, H.J.: Nucl Acid Res: 36, W229-W232 (2008)
11. Lyskov, S., Gray, J.J.: Nucl Acid Res: 36, W233-W238 (2008)
12. Li, H.L., Gao, Z.T., Kang, L., Zhang, H.L., Yang, K., Yu, K.Q., Luo, X.M., Zhu, W.L., Chen, K.X., Shen, J.H., et al.: Nucl Acid Res: 34, W219-W224 (2006)
13. Morris, G.M., Goodsell, D.S., Halliday, R.S., Huey, R., Hart, W.E., Belew, R.K., Olson, A.J.: J Comput Chem: 19, 1639-1662 (1998)
14. Stewart, J.J.P.: J Mol Model: 13, 1173-1213 (2007)
15. Csizmadia, F.: J Chem Inf Comp Sci: 40, 323-324 (2000)
16. Humphrey, W., Dalke, A., Schulten, K.: J Mol Graphs: 14, 33-& (1996)
17. Bikadi, Z., Demko, L., Hazai, E.: Arch Biochem Biophys: 461, 225-234 (2007)
18. Zed, P.J., Krenzelok, E.P.: Amer J Health-Syst Pharm: 56, 1081-1091 (1999)
19. Porubsky, P.R., Meneely, K.M., Scott, E.E.: J Biol Chem: 283, 33698-33707 (2008)

[Érkezett: 2009. március 3.]



### Pályázati felhívás

A „Dr. Rácz István Alapítvány” pályázatot hirdet  
PhD hallgatók, ill. három éven belül  
PhD fokozatukat elnyert gyógyszerész szakemberek számára.

Dr. Rácz István professzor mindig szívén viselte a fiatal szakemberek képzését, tudományos ismereteik elmélyítését, bővítését. Ezért az emlékére létrehozott magánalapítvány ezeknek az elveknek alapján elsősorban gyógyszerész PhD hallgatók munkájának segítésére pénzjutalmat ajánl fel, melyet pályázat alapján lehet elnyerni.

#### A pályázat feltétele:

PhD fokozat megszerzésére irányuló tevékenység, vagy 3 éven belül elnyert fokozat.

A pályázathoz 1 példányban csatolni kell:

- az eddigi munkásság rövid összefoglalását, további tervek ismertetését (max. 5 oldal),
- a szakmai önéletrajzot,
- közlemények, előadások, pályamunkák felsorolását (kérjük mellékelni a legjobbnak ítélt publikációk különlenyomatát),
- célszerű támogató javaslatot mellékelni.

A díj évente egy alkalommal, a Semmelweis-napon ünnepélyes keretek között kerül átadásra.

**A pályázható díj összege:** 100.000 forint, mely adómentesen áll rendelkezésre.

**A pályázatok beadási határideje:** 2009. május 15.

A pályázatokat a Semmelweis Egyetem Gyógyszerészeti Intézetébe  
(Budapest, Hőgyes E. u. 7. – 1092) Prof. Dr. Marton Sylvia kuratóriumi elnök  
névére kell eljuttatni (e-mail: marsyl@gyok.sote.hu).

A nyertes pályázót postán értesítjük.

Budapest, 2009. március 10.

„Dr. Rácz István Alapítvány”  
Kuratóriuma



## Enterális és „egyedi” parenterális táplálási terápia alkalmazása a gyermekgyógyászatban

\*TURMEZEINÉ HORVÁTH JUDIT, DEZSÓFI ANTAL, MÁTTYUS ISTVÁN

Semmelweis Egyetem I. sz. Gyermekgyógyászati Klinika, Budapest, Bókay J. u. 53. – 1083

\*Levelező szerző: e-mail: tuju@gyer1.sote.hu

### Summary

**Turmezei-Horváth, J., Dezsőfi, A., Mátyus, I.: Application of enteral and “individual” parenteral nutrition therapies in pediatric patients**

In long-standing stress situation, in malabsorption syndromes we cannot provide the adequate protein and energy intake with enteral nutrition, so we often have to add complementary parenteral feeding. Using combined enteral and “individualised” parenteral nutrition the quality of life improves, the time of hospital stay decreases. The parenteral nutrition of neonates and infants implies a great challenge for health care supplier; there is no available „All-in-One” mixture infusion below 2 years of age. We developed a new chart for parenteral nutrition, which can be modified easily according to the patient's age, body weight, need. This chart was introduced to the “Guidelines of the Infant and Pediatric Board” in 2003 and accepted by the Health Ministry in 2006. The Central Pharmacy of the Semmelweis University prepares the “individualised” parenteral mixture in laminar air-flow box, in aseptic condition. Further advantage of the Infusion Mixture, that 4-day portion can be prepared. We review the usefulness and the development of combined enteral and “individualised” parenteral nutrition. Altogether we had 30 patients needing total parenteral nutrition (TPN) in the last 5 years: 46% short bowel syndrome, 18% oesophageal disorders, 15% oncology patients, 21 % septicæmia and other disorders. Beside the “individualised” parenteral nutrition the use of enteral formulas increased, too. Our goal is the optimal combination of parenteral and enteral nutrition in order to diminish the hospital stay and to improve the quality of life of our patients.

### Összefoglalás

Tartós stresszhelyzetben, felszívódási zavarokban, valamint a táplálékfelvétel különböző problémáiban a szervezet „csak” enterális táplálkozással nem képes fedezni az energia- és fehérjeigényét, ezért kiegészítő parenterális táplálást is szükséges alkalmazni. Tapasztalataink szerint a kombinált, enterális és „egyedi” parenterális táplálási terápia alkalmazása javítja betegeink életminőségét, miközben az ápolási feladatokat és a fekvőbeteg-napok számát is csökkenti.

Az újszülöttek és a csecsemők mesterséges táplálása sok nehézséggel jár, ezért minden új próbálkozás segítheti a betegellátást. Kétéves kor alatt nincs gyári, életkornak megfelelő „All-in-One” keverékinfúzió, ezért a Semmelweis Egyetem I. sz. Gyermekgyógyászati Klinikán kidolgozott, „egyedi keverékinfúzió” táblázat segítséget jelent, mely alapján az infúzió összetétele rugalmasan alakítható a beteg életkorának, betegségének, egyéb igényeinek megfelelően. A receptesíthető „egyedi keverékinfúzió” vagy Total Parenteral Nutrition (TPN) táblázat 2003-ban bekerült a „Csecsemő és Gyermekgyógyászati Kollégium Irányelvek” ajánlásába, 2006-ban pedig az Egészségügyi Minisztérium szakmai protokolljába is. A keverékinfúzió további előnye, hogy egyszerre 4 napi adag készíthető el etil-vinil-acetát (EVA) műanyag zsákokban. A Semmelweis Egyetemen az Egyetemi Gyógyszertár Gyógyszerügyi Szervezési Intézet (a továbbiakban Egyetemi Gyógyszertár) igény szerint, speciális „laminar air-flow-box”-ban aszeptikus körülmények között, magisztrális készítményként állítja össze a kért, betegre szóló „All-in-One” keverékinfúziókat.

Dolgozatunkban bemutatásra kerül a kombinált, enterális és „egyedi” parenterális táplálási terápia klinikai alkalmazásának fejlődése és a diagnózisonkénti megoszlása. Összesen 30 beteg szorult egyedi TPN-re az elmúlt 5 évben, 14 leány és 16 fiú. A diagnózisonkénti százalékos megoszlás a következő volt: rövidbél-szindróma 46%, oesophagus problémák 18%, onkológiai beteg 15%, szepszis, illetve egyéb súlyos betegség 21%. Az egyénre szabott parenterális keverék-infúzió alkalmazása mellett az utóbbi időben örvendetesen növekedett az ivó- és szondatápszerek, a két év feletti betegeknél a gyári „All-in-One” készítmények használata. Lehetőség szerint egymást kiegészítve alkalmazzuk az enterális és parenterális tápoldatokat, a jövőben pedig még tudatosabban beépítjük ezt az elvet a táplálási terápiánk stratégiájába, hogy javítsuk betegeink életminőségét, életkilátásait, legsúlyosabb esetben kilátásba helyezve a béltranszplantációt.

### Bevezetés

A mesterséges táplálás elméletével, klinikai fontosságával számos nagyszerű előadás, közlemény foglalkozik. Dolgozatunkban részletesebben a teljes parenterális táplálás (TPN) gyakorlati bemutatását tűztük ki célul, hogyan fejlődött alkalmazása, majd a kombinált táplálási terápia mai gyakorlatának adatairól számolunk be.

2002-ben a Semmelweis Egyetem I. sz. Gyermekgyógyászati Klinikán (a továbbiakban I. sz. Gyermekgyógyászati Klinika) a táplálási terápia felépítésénél az addigi gyakorlathoz képest, a teljes parenterális táplálás vonatkozásában egy új megoldást kezdtünk alkalmazni, melynek megszületése nagyrészt annak volt köszönhető, hogy összevontuk az orvosi gondolkodást a klinikai gyógyszerészi gyakorlattal, gondolkodással. Ez az együttműködés egy új táblázatot eredményezett, amit azóta általános receptként használunk a TPN terápia felépítésénél (*I. táblázat*). A táblázat 2003-ban bekerült a „Csecsemő és Gyermekgyógyászati Kollégium Irányelvek” ajánlásába, 2006-ban pedig az Egészségügyi Minisztérium szakmai protokolljának része lett [1, 2].

### Vizsgálati módszer

Az egyedi keverékinfúziók összeállításához 2003 óta az „egyedi keverékinfúzió” táblázatot használ-

juk a teljes parenterális táplálást biztosító oldatok elkészítéséhez, mely az a táblázat receptesítve, amit a tápanyagszükséglet kiszámításánál addig és ma is használ az orvosi gyakorlat [3]. A különbség az, hogy az orvosok által használt táblázatban „g/ttkg/nap” és „mmol/ttkg/nap” a számolás alapja, az új táblázatban pedig ml/ttkg/nap az alap, ami egy általánosan használható egyedi igényekre adaptálható recept megírását teszi lehetővé. Ennek alapján készíthető el a Magyarországon forgalomba hozott gyógyszerekből az egyedi, betegre adaptált keverékinfúzió (*II. táblázat*) [4, 5]. Két év feletti életkorra ma már van forgalomban gyári, 3 zsákos „All-in-One” infúzió, azonban az új táblázatnak most is van létjogosultsága, elsősorban a két év alatti súlyos, TPN-re szoruló betegek esetében.

A táblázat teljesen rugalmasan változtatható, bármilyen életkorra, súlyra, betegség következtében megváltozott anyagcsereviszonyokra. Természetesen a keverékinfúzióba beletesszük a nyomelemeket, vízben és zsírban oldódó vitaminokat is.

A Semmelweis Egyetemen az Egyetemi Gyógyszertár aszeptikus körülmények között, gravitációs pumpájú „laminar air-flow-box”-ban elkészíti a klinikán összeállított recept alapján a keverékinfúziót. Az egyedi receptet faxon vagy e-mailen küldjük el az Egyetemi Gyógyszertárnak.

Kiemelendő még a glutamin-pótlás szerepe a csak TPN terápiaiban részesülő betegeknél, külö-

*I. táblázat*

*Egyedi keverékinfúzió összetétele*

ml/ttkg/nap	1. életév	2. életév	3.–5. életév	6.–10. életév	10. – 14. életév
Glucose 20% inf.	40 – 75	60 – 75	60	50	40
Aminoven infant 10% inf.	15 – 25	15	15	10	10
Lipofundin MCT 20 % inf.	10 – 15	10 – 15	5 – 10	5 – 10	5
NaCl 10% inj.	1,17	1,17	1,17	1,17	1,17
Panangin inj.	3,62	3,62	3,62	3,62	3,62
Calcimusc 10 % inj.	3,62	3,62	3,62	3,62	3,62
Glukóz-1-foszfát Fresenius	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
KCl 10% inj.	0,78	0,78	0,78	0,78	0,78
Folyadék ml/ttkg/nap	75 – 140	95 – 130	90 – 105	70 – 90	65 – 70
Energia kcal/ttkg/nap	56 – 97	72 – 93	63 – 72	53 – 62	45

## II. táblázat

„Egyedi keverékinfúzió” rendelőlapp-minta egy 10 kg testtömegű beteg részére

<b>EGYETEMI GYÓGYSZERTÁR (EGYGYSZI) Budapest, (dátum)</b>	
Infúziós labor fax.: 217-0927	
Beteg neve: .....	Osztály: .....
.....	Oszt. vezető főorvos: .....
Szül. dátum: .....	Osztályos orvos: .....
Életkor: ..... Súly: 10 kg	
Diagnózis: .....	Klin. főgyógyszerész: .....
<b>KÉRÜNK</b>	<b>!!! 4 x 1 napi adagot</b>
Glukóz 20 % inf.	600 ml
Aminoven pad.10%	200 ml
Lipofundin MCT 20%	120 ml
NaCl 10% inj.	9,0 ml
Panangin inj.	20 ml
Calcimusc 10% inj.	16 ml
Glukóz-1-foszfát Fresenius	8,0 ml
KCl 10 % inj.	6,0 ml
Peditrace N inj	8 ml
Vitalipid-N inj.	8 ml
	..... ml / 1 nap
+ Dipeptiven 1,5 - 2,0 ml/ttkg/ nap	
+ naponta Soluvit N inj. 1,0 ml/ttkg/ nap	
Laboratóriumi ellenőrzés szükséges!	
Legfontosabb laboratóriumi paraméterek: ionok, TG, CN, vércukor, GPT	
Hűtőszekrényben tárolandó! Mélyhűtőbe tenni TILOS!	

nösképpen kritikus állapotú betegek esetén. A glutamin könnyen bomlik, ezért szükséges alaninhoz kötni és dipeptid formában külön termékként kezelni, utólag a keverékinfúzióhoz adni. Az esszenciálissá váló aminosavat, nemcsak a bél mucosa épiségének fenntartása miatt, hanem az immunmoduláció, szöveti védelem, glutation és az antioxidáns kapacitás megőrzése, az anyagcsere fenntartása miatt kell naponta a keverékinfúzióhoz adni, lásd trauma, szepszis, sebészi beavatkozás előtt [6, 7]. Az egyedi keverékinfúzió további előnye, hogy a finom kolloid tápoldatot 4 napra előre el lehet készíteni. Történtek már mikroszkópos vizsgálatok a zsírcseppek méretének ellenőrzésére több napon át, zéta-potenciál vizsgálatok, hogy a felhasználhatósági időt pár nappal meg lehessen hosszabbítani. A kedvező eredmények ellenére, kevés adat miatt, ezek az eredmények még megerősítésre várnak [8].

Az egyedi TPN alkalmazásban még egy dolog nagyon fontos: eleinte naponta, majd 1-2 hetente ellenőrizni kell a laboratóriumi paramétereket (szérum elektrolit, urea, triglicerid, vércukor), valamint a súlygyarapodást folyamatosan figyelembe véve át kell számolni a komponensek mennyiségét [9, 10].

Az alábbiakban egy eset kapcsán is szeretnénk bemutatni a keverékinfúzió hasznosságát. Az első beteg, akinél először alkalmaztuk a receptesített táblázatot, hamar otthonába távozhatott. Ő súlyos gastroesophagealis reflux miatt került a klinikára fél évesen, nagymértékű súlycsökkenéssel. A sebészeti beavatkozás a beteg kritikus állapota miatt nem volt kivitelezhető, a táplálás biztosítására képzett gasztrosztómája, majd ennek sikertelensége miatt kialakított jejunosztómája nem működött. A nem kielégítő táplálás miatt tovább fogyott, közben

szepszis miatt 2800 g alá esett a súlya. A súlygörbéből is látni, hogy klinikára kerülés 22. napjától kezdtük el az egyedi TPN-terápiát és alig egy hónap után megindult a beteg súlynövekedése, majd

hamarosan haza lehetett adni *per os* etetés mellett (1. ábra).

A sikertörténetet még az is tetézi, hogy a gyermek fejlődése következtében oka fogyottá vált a műtét, a kislány növekedésével a korábbi problémái megszűntek [11].

Az utóbbi években a TPN mellett egyre inkább előtérbe került a gyermekgyógyászatban az enterális szonda- és ivótápszerek alkalmazása. 2008-ban negyedév alatt klinikánkon majdnem annyit használtunk el belőle, mint 2007 egész évében. Közben csökkent a gyári „All-in-One” oldatok felhasználása, az egyedi keverékinfúziók javára, de még így is feltételezhetjük, hogy az enterális tápoldatok bátrabb használatával esetleg megelőzhetünk parenterális táplálást (2. ábra).

Időközben kicsit módosult klinikánk betegprofilja, amit a 3. ábráról is leolvashatunk. 2007-ben az onkológiai betegek átkerültek a II. sz. Gyermekgyógyászati Klinikára, klinikánk profilja pedig Pszichiátriai Osztállyal bővült. Az egyéb betegcsoportban azóta van egy anorexiás beteg is, akinél a szondatáplálás nem volt elegendő.

Összességében az I. sz. Gyermekgyógyászati Klinikán nőtt az egyedi keverékinfúzióval mesterségesen táplált betegek száma az évek során. Talán a jobb odafigyelés is közrejátszott az adatok alakulásában.

A diagnózisok előfordulásának százalékos gyakorisága az alábbi:

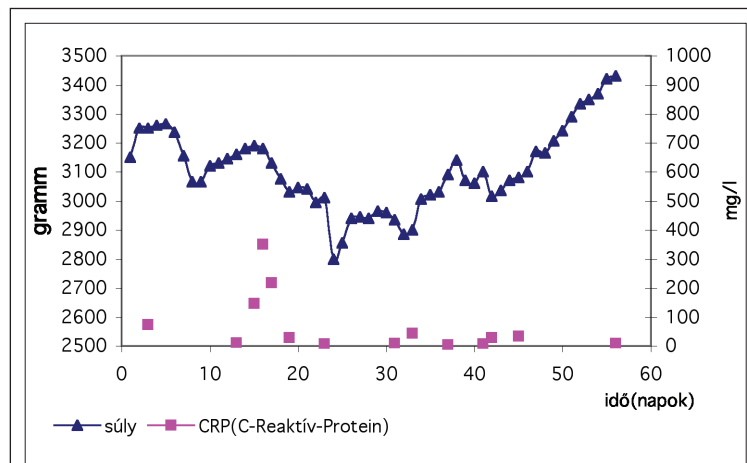
- rövidbél szindróma: 46%,
- onkológiai kórkép: 15%,
- oesophagus probléma: 18%,
- egyéb: 21%.

Alapelveként megállapíthatjuk, hogy a *per os*, enterális táplálást építsük fel először, és csak akkor kezdjük el a parenterális táplálást, ha 3 napig nem tudjuk más módon fedezni a szervezet energiaszükségletét [12, 13].

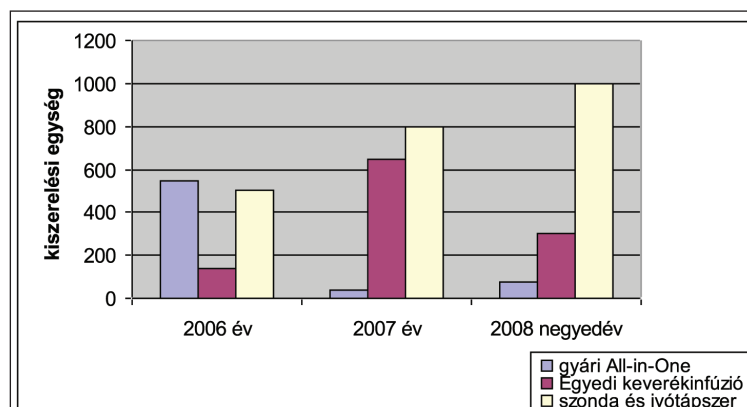
### Megbeszélés

#### Az egyedi parenterális táplálás előnyei

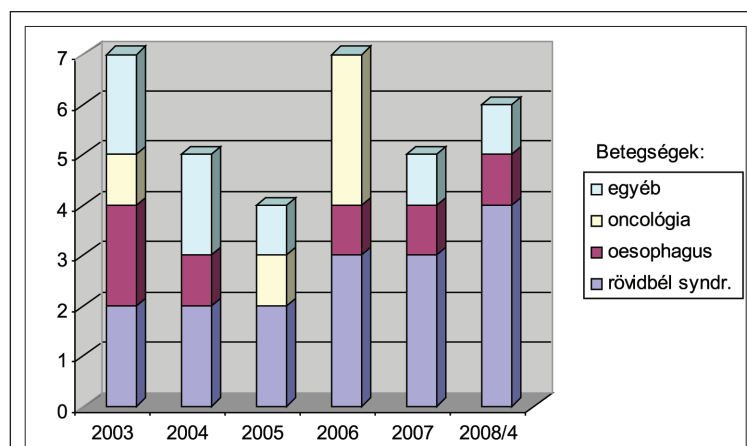
Jobban hasznosulnak az egyidejűleg alkalmazott tápanyagok folyamatos (20-22 óra, de minimum 15 óra) cseppinfúziós



1. ábra: Az esetismertetésben szereplő beteg testtömeg görbéje



2. ábra: Az enterális és parenterális táplálás alakulása 2006-2008 között az I. sz. Gyermekgyógyászati Klinikán



3. ábra: Az egyedi parenterális táplálás alakulása diagnózisonként 2003-2008 / negyedév között [5]

táplálással. A laborparaméterek mérése is igazolja, hogy a jól beállított komponensek mennyiségein keveset kell változtatni az idő múlásával. A betegek közérzete, nyugtalansága látványosan javul. Csökken az anyagcsere-szövődmények előfordulása, ami a korábbi táplálási gyakorlat során az egyenetlen tápanyag-adagolásból is származhatott [2]. Egy-szerre 4 napi adag készíthető el betegenként, akiknél könnyebb ellenőrizni a táplálás menetét. Csökken az infekciók előfordulása, kevesebb az antibiotikum-igény, eszközfelhasználás. A betegek ápolása és gyógyszerelése is könnyebbé válik, időmegtakarítás érhető el a nővéri feladatokban. Összegezve csökken az ápolás költsége.

Az egyedi TPN-infúzió nemcsak a <2 éves betegek életminőségét javítja, hanem annak a felnőtt vagy nagyobb gyermeknek az életminőségét is, aki valamilyen okból egyedi, átlagtól eltérő terápiára szorul.

#### *A jövő lehetőségei*

Állandó orvosi, klinikai gyógyszerész kontroll mellett, gondos szülőkkel a házi ápolás jogi útját rugalmasabbá, gyorsabbá kellene tenni. A „klinikai gyógyszerész” bevonása a táplálási team-be biztosítaná betegenként a megfelelő szakmai kontroll feltételét a táplálási terápia alkalmazásánál. A táblázat használatának felügyelete fontos, akárcsak a laboratóriumi eredmények validálása, mert tapasztalatunk szerint az esetleges változtatások megítélése csak laboratóriumi eredményekre támaszkodva hibalehetőséget rejt magában. Természetesen folyamatosan nyomon kell követni a testsúlyt, a laboratóriumi eredményeket (szérum elektrolitok, triglicerid, urea, transzamináz, vércukor stb. szintjeit) is.

Hosszú távon nő a betegek életkilátása, javul a bél-transzplantáció túlélési statisztikája.

#### IRODALOM

1. Machay, T., Tulassay, T.: Teljes parenterális táplálás csecsemő- és gyermekkorban. Csecsemő- és Gyermekgyógyászati Szakmai Kollégium Irányelv Útmutató 2003. június. (Különszám): 95-103.
2. Egészségügyi Minisztérium Szakmai protokoll: Teljes parenterális táplálás (TPT) csecsemő- és gyermekkorban. Eü. Közl. 57(5) II. köt. (2006).
3. Empfehlungen der AKE/DAKE: Empfehlungen zur parenteral Infusions- und Ernährungstherapie im Kindesalter. Infusionstherapie 14(1) 41-44. (1987)
4. Turmezei-Horváth, J., Dezsőfi, A.: Kombinált, enterális és „individuális” parenterális táplálási terápia alkalmazása az I.sz. Gyermekgyógyászati Klinikán. Magyar Gyermekgyógyászati Társaság és a Magyar Gastroenterológiai Társaság Gyermekgastroenterológiai Szekciójának XXV. Tudományos Ülése 2008; 10: 52.
5. Turmezei-Horváth J., Dezsőfi A.: Gyermekgyógyászat 60(1) 87-90. (2009)
6. Tubman, T., Thompson, S., McGuire, W.: Cochrane Database Syst 2005 Rev; 25:CD001457.
7. Wischmeyer, P.E.: Curr Opin Crit Care 12(2) 142-8. (2006)
8. Turmezei-Horváth, J., Kincs, J., Bókay, J., Balogh, J., Zelkó, R., Vincze, Z.: Gyógyszerészet 47. Congressus Pharmaceuticus Hungaricus XII. különszám: 91. (2003)
9. Arató, A.: Gyermekgyógyászat 47(2) 122-128. (1996)
10. Varga, P.: A klinikai táplálás elmélete és gyakorlata. Melania kiadó, Budapest, 1998.
11. Turmezei, J., Balogh, L., Mátyus, I., Kálmán, I., Zelkó, R.: Total Parenteral Nutrition (TPN) in neonates using a unique mixture infusion. 2nd ACCP-ESCP International Congress on Clinical Pharmacy Joint Meeting 2004; Optimizing in Pharmacotherapy NUTR.016: 95.
12. Heidegger, C-P., Romand, J-A., Treggari, M.M. Pichard, C.: Intensive Care Med. 33. 963-969. (2007)
13. Kreymann, K.G., Heer G.de, Felbinger, T., Kluge, S., Nierhaus, A., Suchner, U., Meier, R.F.: Internist. 48. 1084-1092. (2007)

[Érkezett: 2009. március 5.]





## Felületen lejátszódó jelenségek szerepének vizsgálata a bevonó folyadékok előállítása során

BÖLCSKEI ÉVA, BAJDIK JÁNOS, \*HÓDI KLÁRA

Szegedi Tudományegyetem, Gyógyszer technológiai Intézet, Szeged, Eötvös u. 6. – 6720

\*Levelező szerző: e-mail: klara.hodi@pharm.u-szeged.hu

### Summary

Bölcskei É., Bajdik J., Hódi K.: *Evaluation of phenomena detected on the surface of stirred coating liquid*

The main objective of this work was to study the effect of conditions of coating fluids through the properties of the coating fluid, film and coated product. With a more accurate understanding of the process the effects of the factors can be defined and by means of this the optimal composition can be determined and problem-free coating can be carried out. In this work the evaporation was studied. The effects of different operational factors on evaporation were studied through fluids of different compositions. In case of fluids containing ethanol a significant loss can be detected after a short period of time and this fact cannot be changed by the use of an antifoaming agent. The highest difference in effect of a given factor was detected for the stirring rate. The effect of the operational factors changed depending on the composition. Stirring rate showed the highest sensitivity to the presence of the volatile component. These results can help to determine the critical control points and the optimal stirring circumstances.

### Összefoglalás

Munkánk során a bevonó folyadék, film és bevont termékek tulajdonságain keresztül tanulmányozzuk a bevonó szuszpenzió előállítási körülményeinek hatását. Célunk, hogy a folyamat pontosabb megértésével definiáljuk azokat a faktorokat, amelyek segítségével az optimális összetétel definiálható és a problémamentes bevonás megvalósítható. A munka ezen részében a keverés során fellépő felületi jelenségek közül a párolgást vizsgáltuk. Az egyes keverési paraméterek párolgásra kifejtett hatását különböző összetételű folyadékok esetén tanulmányoztuk. A 96%-os etanol tartalmú folyadékok esetén már rövid idő alatt is jelentős veszteség figyelhető meg és ezt a felületen feldúsuló habzásgátló is csak csekély mértékben képes megváltoztatni. A műveleti paraméterek közül a legjelentősebb a keverési sebesség volt. Az egyes keverési faktorok hatása az összetétel függvényében változott. Az illékony komponens jelenlétére a keverési sebesség mutatta a legnagyobb érzékenységet. Az itt nyert megállapítások – összekapcsolva a homogenitás vizsgálatok eredményeivel – hozzásegítenek a kritikus pontok megismeréséhez és így az optimális keverési körülmények definiálásához.

### Bevezetés

A szilárd gyógyszerformák előállításakor a filmbevonás egyre gyakrabban alkalmazott műveletté vált. Előnyös tulajdonsága, hogy kis tömegnövekedés mellett, a gyomor-béltraktusnak szinte bármelyik szakaszán oldódó, illetve diffúziót biztosító védőréteg kialakítását teszi lehetővé. A filmbevonás során a megfelelő tulajdonságokkal rendelkező makromolekulás anyagok használhatók, amelyek a mag felületén egy egyöntetű filmbevonatot alakítanak ki. A polimereket feldolgozhatjuk oldatos (vizes és szerves), emulziós és szuszpenziós (vizes diszperzió) formában. Az egyes oldószernek a kialakult film szerkezetére és tulajdonságaira gyakorolt hatása ismert [1]. A vizes oldatok alkalmazhatóságát korlátozza a polimer oldhatósága. A polimerek feldolgozásánál korábban a szerves oldószereket alkalmazták. Ezek azonban napjainkban csak abban az esetben kerülnek felhasználásra, ha alkalmazásuk elkerülhetetlen (pl. nedvességre érzékeny

komponensek esetén). Ennek oka, hogy a szerves oldószer a gyógyszerformában visszamaradva toxikus hatásokat válthat ki, ezen kívül robbanás- és balesetveszélyesek, költségesek és a követendő környezetvédelmi előírások is szigorodnak [2]. Ezen problémák ellenére bizonyos komponensek (főként etanol) kis mennyiségét a vizes diszperziókban és oldatos rendszerekben koszolvensként még használják [3, 4]. A vizes diszperziók feldolgozhatósága a rendszer speciális összetétele és ennek érzékenysége miatt komplexebb, mint az oldatos rendszereké [5-8]. Az ilyen típusú rendszerek oldhatatlan részek formájában tartalmazzák a polimert. Előállításuk különböző módon történhet (általában emulziós polimerizációval), de valamennyi esetben közös, hogy a polimer mellett felületaktív komponenst is tartalmaznak. A kis viszkozitású folyadékokból a filmképződés során a különálló részecskéknél (0,1-1,0  $\mu\text{m}$ ) fuzionálni kell, amely a minimális filmképződési hőmérséklet felett egy összetett folyamat eredőjeként következik be.

Számos segédanyag (lágyítószer, színező és fényvédő pigment stb.) alkalmazható a filmbevonat tulajdonságainak megváltoztatására és a bevonó folyadék alkalmazhatóságának elősegítésére. A permeábilis filmbevonatot kialakító polimerek esetében különösen fontos ismernünk ezen anyagok típusát, oldhatóságát. Ezek a bevonatok a gasztrointesztinális traktusban oldhatatlanok, de a kioldóközeg hatására megduzzadnak és vízre, valamint a feloldódott hatóanyagra permeábilissá válnak [9]. Így azok a faktorkok, amelyek megváltoztatják a film szerkezetét, jelentősen módosíthatják a kioldódási profilt is. Ilyen célra leggyakrabban az akrilát típusú polimerek vizes diszperzióit alkalmazzák. A különböző akrilát típusú polimerek oldékonyságát a kémiai szerkezetük határozza meg [4]. Egyes neutrális, homo- és kopolimerek a fiziológiás pH tartományban oldhatatlanok, ugyanakkor permeábilisek. Az egyik leggyakrabban alkalmazott, ilyen típusú termék az etilakrilát és metil metakrilát kopolimert tartalmazó Eudragit NE, amely 30 és 40%-os diszperziók formájában kerül forgalomba.

A vízben oldhatatlan részecskéket és polimer diszperziókat tartalmazó bevonó folyadékok előállítása nagy körültekintést igényel. A polimer diszperziók gyártói szerint ezt két lépésben célszerű megvalósítani. Az első lépés a pigment szuszpenzió előállítása, amikor intenzív keveréssel a segédanyagoknak (glidánsok, pigmentek, lágyítók és más összetevők) vízben történő intenzív homogenizálása történik [10]. Ezek után a frissen elkészített homogén pigment szuszpenziót és a polimer diszperziót kíméletesen kell összekeverni. Az intenzív keverés a polimer precipitációját okozza, valamint habzás is fellép, ezért ilyen eszközök nem használhatók ebben a lépésben [4, 11]. Tehát az oldhatatlan részecskének a pigment szuszpenzióban történő egyenletes eloszlása (esetleg nedves őrlése) nagyon fontos, mert kíméletes keveréssel ezt már nem lehet elérni.

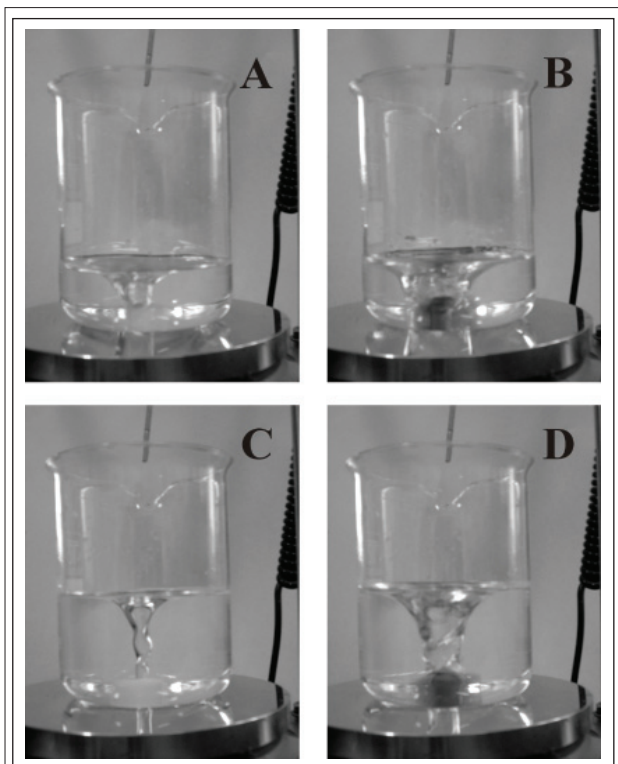
A keverés során lejátszódó jelenségek megismerése mindenképpen indokolt, hiszen csak ezek részletes feltérképezése nyújthat megfelelő információkat a kritikus kontrollpontok definiálásához. A bevonó folyadék előkészítése és folyamatos keverése közben felléphet a habzás. Ezt elősegíti a diszperziókban található felületaktív komponens is. A folyadékban létrejövő kis buborékok ellen alkalmazhatunk valamilyen habzásgátló anyagot, mivel a habképződés gyakran okoz felületi egyenetlenséget a keletkező filmben. Ezek következtében módosíthatják annak védő funkcióját. Intézetünkben ezt a jelenséget a vizes diszperzióból

készült film esetében már korábban vizsgáltuk [12]. Habzásgátlóként elsősorban különböző szilikon-származékokat alkalmazunk (pl.: dimeticon, szilikonolaj) [13]. Ezek kis felületi feszültséggel rendelkeznek és így sokkal jobban abszorbeálódnak a levegő/folyadék határfelületen, mint a habzó ágens, de nem rendelkeznek a tulajdonsággal, hogy stabil habot képezzenek [11].

A polimer diszperzió és a pigment szuszpenzió keverése során összetett jelenségekkel állunk szemben. Jól ismert, hogy a keverés alatt örvénykúp jön létre, amely leírása elsősorban fizikai és kémiai megközelítésből ismert [14-16]. Ezen jelenségnek a gyógyszertechnológiában betöltött szerepét ez idáig kellő részletességgel nem tanulmányozták, annak ellenére, hogy ezek az információk segíthetik egyes gyógyszerformák (pl. a bevont termék) előállítási folyamatában a kritikus pontok pontos meghatározását. Ezen adatok feltérképezése és így a gyártási folyamat mélyebb megértése a Folyamatelemző Technológia (Process Analytical Technology - PAT) középpontjában áll [17].

A polimer diszperzió és a pigment szuszpenzió homogenizálását, valamint ennek hatékonyságát korábban tanulmányozva az egyes beállítási paraméterek interakcióinak szerepe szembetűnő volt [18]. Ezért kezdtük el a fenti tényezőknek a keverési kúp kialakítására gyakorolt hatásának vizsgálatát. Az interakciók magyarázatát közvetve a kúp dimenziójának megváltozásában kerestük. Víz keverése közben jól megfigyelhető volt, hogy nemcsak a térfogatban, de az alakban is szembetűnő változások következnek be (1. ábra). A kúp magassága hasonló volt, de kisebb keverő idom esetén keskenyebb volt. Ez az alakváltozás a turbulens mozgás jelentős változását indukálja, így a szemcsék mozgása is igen eltérő lehet. A kúp alakjának vizsgálata a nem transzparens folyadékok esetén ilyen módon nem lehetséges. Ebben az esetben indirekt módszerekkel, például a felület megváltoztatásán keresztül lehet következtetéseket levonni. Kimutattuk, hogy a szélesebb keverési kúp nagyobb felszín kialakulását okozta, következtésképpen intenzívebb habzást indukált.

A munka jelen részében az volt a célunk, hogy egy felületi jelenség szerepét tovább vizsgáljuk azért, hogy kihangsúlyozzuk a keverési kúp dimenziójának megváltozásával összefüggő problémák fontosságát. Tanulmányoztuk az illékony komponenst (etanolt) tartalmazó bevonó folyadékok keverés hatására bekövetkező párolgásának mértékét. Az etanolt kis mennyiségben (10-20%) a



1. ábra: Víz keverésénél kialakuló kúp összehasonlítása

(A: mennyiség 100 g, keverő tömege 1,73 g;

B: mennyiség 100 g, keverő tömege 3,43 g;

C: mennyiség 200 g, keverő tömege 1,73 g;

D: mennyiség 200 g, keverő tömege 3,43 g)

film szerkezetének módosítására és a feldolgozhatóság javítására használják [3, 4]. Vizsgáltuk a keverési paraméterek hatását a különböző összetételű folyadékok párolgási veszteségére. A másik felületi jelenség, a habzás kiküszöbölésére alkalmazott polidimetilsziloxán típusú habzásgátló segédanyag különböző koncentrációinak befolyását is tanulmányoztuk. Ez a komponens kis felületi feszültségének köszönhetően a folyadék felületén egy réteget képezve fejti ki habzásgátló hatását. Azt feltételeztük, hogy optimális esetben ez befolyásolhatja az illékony komponens párolgását egy vele közel azonos sűrűségű folyadékból.

### Kísérleti rész

#### Anyagok

Eudragit NE 30D (Evonik Industries AG, Darmstadt) diszperziót használtunk modell anyagként. A vízben gyakorlatilag oldhatatlan és alkoholban is csak kevésbé oldódó polidimetilsziloxán-származék Dimeticon E 1049-et alkalmaztuk habzásgátló segédanyagként [13]. Illékony komponensként 96%-os

etanol került alkalmazásra. A fenti komponensek felhasználásával 4 különböző összetételű állítótunk elő. A habzásgátló komponens koncentrációja nagyobb volt, mint amit általában használnak, de esetleges hatása ez esetben szembetűnőbb lehet.

#### Keverék 1.:

Eudragit NE 30D .....	50%
Desztillált víz.....	50%

#### Keverék 2.:

Eudragit NE 30D .....	50%
Desztillált víz.....	30%
96%-os alkohol .....	20%

#### Keverék 3.:

Eudragit NE 30D .....	50%
Desztillált víz.....	27%
96%-os alkohol .....	20%
Dimeticon E 1049.....	3%

#### Keverék 4.:

Eudragit NE 30D .....	50%
Desztillált víz.....	24%
96%-os alkohol .....	20%
Dimeticon E 1049.....	6%

#### Párolgott mennyiség meghatározása

A tömegvesztést a különböző folyadékminták keverése közben mértük. A keverést IKA lapátos keverővel (IKA-Werke GmbH & Co. KG, Staufen) végeztük. Azonos dimenziójú keverőt és edényt alkalmaztunk minden esetben. A műveletet kontrollált körülményeket ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ , 45% RH) biztosító klíma szobában (Heinrich Heine Egyetem, Düsseldorf) hajtottuk végre. Az elpárolgott mennyiséget a folyadék analitikai mérlegen történő mérésével követtük nyomon. Kiindulásképpen az adott körülmények között megmértük külön-külön az egyes összetevők párolgását is. Egy 7 cm átmérőjű Petri-csészébe az egyes folyadékokból 5 g-ot öntöttünk és lefedetlenül vízszintes felületre helyeztük. A tömegüket adott időpontokban meghatároztuk és ebből a veszteséget számítottuk. Valamennyi esetben három párhuzamos mérést végeztünk.

#### Kísérlettervezés

A különböző műveleti paraméterek matematikailag meghatározott hatásait faktoriális kísérlettervezés segítségével hasonlítottuk össze. E faktorok



I. táblázat

A faktorok és értékei

	Alsó szint	Alapszint	Felső szint
Keverési sebesség ( $X_1$ )	300 rpm	500 rpm	700 rpm
Keverési idő ( $X_2$ )	10 perc	15 perc	20 perc
Mennyiség ( $X_3$ )	100 g	150 g	200 g

fontossága informatív lehet a folyadék összetételének és a filmbevonás során alkalmazott állandó keverés optimális paramétereinek a meghatározásához.

Minden összetételnél  $2^3$  teljes faktoriális tervet alkalmaztunk egy középponti helyzettel, így 9 beállítással dolgoztunk (I. táblázat).

A munkánk során Statistica for Windows 7.1 AGA (StatSoft, Inc. Tulsa) szoftvert alkalmaztunk és a kísérleteket véletlenszerű sorrendben végeztük el. A válaszfelszín meghatározásához a következő lineáris megközelítést alkalmaztuk:

$$y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{123}X_1X_2X_3$$

### Eredmények

Először a különböző kiindulási komponenseknek keverés nélkül bekövetkező tömegvesztését mértük meg. Minden időpontban az etanol tömegvesztése volt szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) a legnagyobb (II. táblázat). A másik három anyag esetén a vesztés közel azonos volt. Az etanol párolgásának mértéke minden pontban kb. ötször-hatszor nagyobb volt, mint a többi mintáé.

Mielőtt a keverékek párolgási vesztését meghatároztuk volna, megvizsgáltuk 20 °C-on az alkohol tartalmú keverék és a habzágatólósűrűségének viszonyát. Erre azért volt szükség, mert csak közel azonos sűrűségértékeknél várható, hogy a habzás-

gátló segédanyag a felületi feszültség miatt a felületen dúsuljon fel. Ha ezek eltérőek, akkor inkább a sűrűségkülönbség miatti elkülönülések figyelhetők meg. A sűrűségkülönbség azonban viszonylag csekély volt (Keverék 2. =  $0,986 \pm 0,001$  g/cm<sup>3</sup>; Dimeticon E 1049 =  $0,990 \pm 0,001$  g/cm<sup>3</sup>), ezért valószínűsíthető, hogy kis felületi feszültségének megfelelően a Dimeticon a felületen fog egy réteget képezni és ott kifejteni habzágatólósűrűségét.

A keverékek párolgási vesztéseit a III. táblázatban foglaltuk össze. A különböző folyadékok a különböző keverési körülmények hatására eltérő mértékű párolgást mutattak. Minden esetben a legnagyobb értéket a nagy keverési sebességnél, hosszú keverési időnél és alacsony kezdeti mennyiségnél figyeltük meg. Nagyon kismértékű párolgást mutatott a Keverék 1., míg a Keverék 2., 3. és 4. esetében sokkal nagyobb (kb. 3-4-szer nagyobb) tömegvesztés következett be. A legnagyobb vesztést indukáló beállítás esetén az etanol jelenléte kb. 3%-os növekedést okozott. Ennek oka az illékony etanol intenzívebb párolgása volt, vagyis ez az elpárolgott többlet mennyiség (3%) etanol vesztést okozott, ami az elegyített etanolnak közel 15%-os elvesztését jelentette. Ezáltal még a rövid idejű keverés (20 perc) során is drámaian megváltozik a bevonó folyadék összetétele. Ez a jelenség módosíthatja a filmbevonat viselkedését, mivel jól ismert, hogy az etanol jelenléte megváltoztathatja a film szerkezetét [19]. A Dimeticon E 1049 nagy koncentrációban ugyan kis mértékben csökkentette a párolgást (6%-os mennyiségben),

II. táblázat

A kiindulási komponensek párolgása

Idő (min)	Víz (gramm)	96%-os etanol (gramm)	Dimeticon E 1049 (gramm)	Eudragit NE (gramm)
10	1,43 ± 0,14	7,09 ± 0,46	1,41 ± 0,05	1,37 ± 0,21
20	2,37 ± 0,36	11,65 ± 1,04	2,57 ± 0,06	2,15 ± 0,17
30	3,30 ± 0,41	18,56 ± 1,77	3,55 ± 0,10	2,85 ± 0,24
60	5,94 ± 0,95	34,12 ± 3,72	6,26 ± 0,10	5,33 ± 0,30
90	8,34 ± 1,25	48,18 ± 5,05	9,02 ± 0,12	7,48 ± 0,53
120	10,95 ± 1,68	63,27 ± 6,86	11,77 ± 0,23	9,94 ± 0,75

III. táblázat

## A párolgási veszteség értékelése

Sebesség (rpm)	Idő (min)	Mennyiség (g)	Keverék 1.	Keverék 2.	Keverék 3.	Keverék 4.
300	10	100	0,20	0,63	0,75	0,61
700	10	100	0,30	2,20	2,35	1,83
300	20	100	0,31	1,39	1,19	1,20
700	20	100	0,80	3,52	3,55	3,04
300	10	200	0,07	0,29	0,27	0,29
700	10	200	0,13	0,62	0,57	0,55
300	20	200	0,11	0,47	0,46	0,51
700	20	200	0,22	1,05	1,15	1,16
500	15	150	0,22	1,07	0,76	0,92

de ez nem mondható releváns csökkenésnek. Megállapítható, hogy ezzel a habzásgátlóval nem érhető el megfelelő párolgáscsökkenés egy olyan rendszerben, amely etanolt tartalmaz.

A válaszfelszín definiálását követően meghatároztuk a különböző faktorokhoz rendelhető, azok hatására utaló együtthatókat, ami lehetővé tette a megalapozott összehasonlítást. A felszínillesztés minden minta esetében nagyon jó volt. Mindig a kezdeti mennyiség volt a legfontosabb faktor, míg a legkisebb hatást a keverési idő esetében tapasztaltuk (IV. táblázat). Ez arra utal, hogy a korábbi eredményeket is figyelembe véve azok a faktorok, amelyek a keverési kúp dimenziójának megváltoztatásán keresztül a felület nagyságát is megváltoztatják, sokkal jelentősebb veszteséget indukálnak, mint a keverési idő. A beállítási paraméterek hatásainak sorrendjében nem volt változás. A kezdeti mennyiségnél ( $X_3$ ) a negatív előjel azt mutatta, hogy minél kisebb a tömeg, annál nagyobb az elpá-

rolgott folyadék relatív mennyisége. Ez azért érdekel említést, mivel a bevonási folyamat során folyamatosan csökken a folyadék mennyisége.

A  $b_0$  érték (az eredmények átlaga) a Keverék 1. esetén volt a legalacsonyabb és a Keverék 2.-nél volt a legmagasabb. A habzásgátló komponens kissé csökkentette ezeket az értékeket, vagyis az átlagos veszteséget.

Az egyes segédanyagok szerepének jobb megértéséhez vizsgáltuk a faktorok hatásainak relatív változását (V. táblázat). Az etanol hatása meghatározható a Keverék 1. illetve 2. összehasonlításával. Látható, hogy az összetétel megváltoztatása a keverési sebességben ( $X_1$ ) okozta a legjelentősebb változást. Ennek a faktornak köszönhető növekedés közel hatszoros volt, míg az átlagos növekedés ( $b_0$ ) esetén kevesebb, mint ötszörös. Vagyis az etanol jelenlétére ez a legérzékenyebb faktor. A másik két faktorban bekövetkező változás mértéke kisebb volt. A faktorok interakciói igen nagy változatosságot mutattak.

IV. táblázat

## A faktorok hatásai

	Keverék 1.	Keverék 2.	Keverék 3.	Keverék 4.
$b_0$	0,26	1,25	1,23	1,12
$b_1$	0,19	1,15	1,24	1,00
$b_2$	0,19	0,67	0,60	0,66
$b_3$	-0,28	-1,33	-1,35	-1,04
$b_{12}$	0,11	0,20	0,29	0,25
$b_{13}$	-0,10	-0,70	-0,74	-0,54
$b_{23}$	-0,12	-0,37	-0,22	-0,24
$b_{123}$	-0,09	-0,08	-0,09	-0,06
$R^2$	0,9939	0,9958	0,9723	0,9927

V. táblázat

## A faktorok hatásainak relatív összehasonlítása (%-ban)

	Változás (Keverék 1. és 2.)	Változás (Keverék 2. és 3.)	Változás (Keverék 2. és 4.)
$b_0$	476,96	98,28	89,83
$b_1$	609,13	107,24	86,39
$b_2$	359,30	90,32	98,59
$b_3$	481,46	101,76	78,62
$b_{12}$	181,90	142,19	125,06
$b_{13}$	673,51	105,88	76,75
$b_{23}$	309,19	58,87	65,99
$b_{123}$	92,15	115,84	71,88

A 3-faktoros interakcióhoz rendelhető érték a Keverék 2. esetében alacsonyabb volt, de ennek fontossága elhanyagolható az alacsony abszolút érték miatt.

Meghatároztuk a habzástgátló segédanyag hatását úgy, hogy összehasonlítottuk a Keverék 2.-t a Keverék 3.-mal és 4.-gyel (V. táblázat). Látható, hogy a habzástgátló komponens nagyobb koncentrációban sem okozta a faktorok fontosságának jelentős csökkenését. Kis fokú változást tapasztaltunk a keverési sebesség ( $X_1$ ) esetében és egy kicsit magasabbat a kezdeti mennyiség ( $X_3$ ) esetében, de ezek nem összevethető mértékű változások az etanol alkalmazásakor bekövetkező módosulással.

### Következtetés

Elmondható, hogy az illékony komponenst nem tartalmazó folyadékban keverés hatására bekövetkező tömegvesztése a vizsgált körülmények között kismértékű volt. A 20% etanolt tartalmazó folyadékban jelentősen megnövekedett a párolgás. Ebben az esetben az illékony komponensnek közel 15%-a párolgott el a 20 perces keverés során. Ezáltal az összetétel jelentősen megváltozik és így a film tulajdonságai is különbözhetnek.

A működési paraméterek hatásait faktoriális kísérlettervezés alapján határoztuk meg. Jól látható volt, hogy az etanol jelenléte a bevonó folyadékban nemcsak a faktorok hatásának mértékét változtatta meg, hanem egymáshoz viszonyított arányukat is. Azok a faktorok, melyek a keverési kúp dimenziójának jelentős változását okozzák, sokkal jelentősebb hatást gyakorolnak a párolgásra is, mint a műveleti idő. Az örvénykúp felületének növelése olyan mértékben fokozta a felületi párolgást, hogy azt a vizsgált, felületen feldúsuló segédanyaggal nem lehetett érdemlegesen csökkenteni.

Következésképpen az ilyen összetételek előállításánál legelőször meg kell határozni az egyes működési paraméterek optimális beállításait. Ez az információ segíthet egy a bevonás során használható speciális keverő berendezés megtervezésében is, mert eredményeink azt mutatják, hogy a nyílt rendszerek nem megfelelőek és az is tudott, hogy a hermetikusan lezárt edényből nem lehetséges a folyadék porlasztása. Mindezeknek a szerepe az illékony komponenst tartalmazó bevonó folyadékoknál felértékelődik, mivel az ilyen anyagok gőze komoly veszélyforrást is jelent. Az alkohol-tartalmú rendszernél a teljesen nyitott rendszer kiküszöbölése környezetvédelmi és munkavédelmi szem-

pontból fontos, a zárt rendszer viszont ezen gázok feldúsulása miatt munkavédelmi szempontból kerülendő (robbanásveszély!).

Az ilyen jellegű információk fontosak lehetnek a bevonó szuszpenziók keverése során fellépő problémák megoldása szempontjából. Mivel ez a technológiai lépés nemcsak a folyadék előállítása során fontos, hanem a bevonás során folyamatosan, ezért a homogenitás biztosításán kívül a felületi jelenségek előfordulását is mindenképpen figyelembe kell venni. Ezeket a faktorokat kritikus pontként célszerű definiálni és az értékeket a bevonás során az igényeknek megfelelően (a csökkenő folyadék-mennyiség miatt) előre beállított program szerint módosítani is szükséges.

### IRODALOM

1. Bauer, K.H., Lehmann, K., Osterwald, H.P., Rothang, G.: Coated Pharmaceutical Dosage Forms, Medpharm GmbH Scientific Publishers, Stuttgart, 1988.
2. Ritschel, W.A., Bauer-Brandl, A.: Die Tablette, Editio Cantor Verlag, Aulendorf. 2002.
3. Regdon jr., G., Kósa, A., Erős, I., Pintye-Hódi, K.: J. Therm. Anal. Calorim. 89, 793-797 (2007)
4. Lehmann, K.: Practical Course in Film Coating of Pharmaceutical Dosage Forms with Eudragit®, Pharma Polymers: Darmstadt, 1999.
5. Bajdik, J., Lebák, G., Berkesi, O., Szabó-Révész, P., Pintye-Hódi, K.: Drug Dev. Ind. Pharm. 33, 141-146 (2007)
6. Bajdik, J., Pintye-Hódi, K., Regdon jr. G., Fazekas, P., Szabó-Révész, P., Erős, I.: J. Therm. Anal. Calorim. 73, 607-613 (2003)
7. Williams III. R.O., Liu, J.: Eur. J. Pharm. Biopharm. 49, 243-252 (2000)
8. Schmidt, S., Müller-Goymann, C.C., Schmidt, P.C.: Int. J. Pharm. 197, 35-39 (2000)
9. Cole G., Hogan J., Aulton M.: Pharmaceutical coating technology, Taylor & Francis Ltd., London, 1995.
10. Eudragit® brochure Röhm GmbH & Co. KG, Pharma Polymers, Darmstadt, 2005.
11. Aulton M.E.: Pharmaceuticals. The Science of Dosage Form Design. Churchill Ltd: Livingstone, 2002.
12. Bajdik, J., Regdon jr. G., Lebák, G., Berkesi, O., Pintye-Hódi, K.: Polym. Advan. Technol. 17, 814-817 (2006)
13. Rowe, R.C., Sheskey, P.J., Weller, P.I.: Handbook of Pharmaceutical Excipients 4<sup>th</sup> Ed., Pharmaceutical Press: London, 2003.
14. de la Cruz, L.M., Ramos, E.: Int. Commun. Heat. Mass. 33, 191-198 (2006)
15. Wong, S.H., Ward, M.C.L., Wharton, C.W.: Sensor. Actuat. B – Chem. 100, 359-379 (2004)
16. Petrov, D.V., Molina-Terriza, G., Torner, L.: Opt. Commun., 162, 357-366 (1999)
17. Davies, B., Ellis, S.: Pharmaceutical Technology Europe 17(8), 17-23 (2005)
18. Bajdik, J., Bölcskei, É., Pintye-Hódi, K.: J. Polym. Eng. 28, 419-430 (2008)
19. Bajdik, J., Regdon jr., G., Marek, T., Erős, I., Süvegh, K., Pintye-Hódi, K.: Int. J. Pharm. 301, 192-198 (2008)

[Érkezett: 2009. március 20.]

## Rossz vízdékonyságú hatóanyagok parenterális gyógyszerformaként történő formulálásánál felmerülő problémák

\*KOVÁCS KRISTÓF, OROSZ TAMÁS, STAMPF GYÖRGY, ANTAL ISTVÁN,  
KLEBOVICH IMRE, LUDÁNYI KRISZTINA

Semmelweis Egyetem, Gyógyszerészeti Intézet, Budapest, Hőgyes E. u. 7. – 1092

\*Levelező szerző: e-mail: kovkrist@gytk.sote.hu

### Summary

Kovács, K., Orosz, T., Stampf, Gy., Antal, I., Klebovich, I., Ludányi, K.: *Difficulties encountered during formulation of a parenteral dosage form containing a poorly soluble drug*

Poor water solubility and consequently the difficulties in formulating a liquid dosage form is a great concern in pharmaceutical development. The importance of this issue is underlined by the fact that 10-30% of marketed drugs and 60-70% of drugs coming from early development stage have solubility problems.

In this paper we summarize the existing solubility enhancing techniques that are applicable in parenteral dosage forms for overcoming the issue. We address the problem of choosing the most adequate solubility enhancing technique and present the considerations that should be kept in mind during formulating the solvent systems. Such questions are for example the possible haemolysing effect of the excipients, pH of the composition and its compatibility with various sterilizing methods. We also focus on the probable technological issues, which may arise in each solubility enhancing method, we present examples for every one of them and where possible the solution to the problem is also proposed.

### Összefoglalás

A rossz vízdékonyság, valamint az ebből adódó folyékony gyógyszerformákat érintő nehézségek megoldása a gyógyszer technológia egyik legfontosabb feladata. A probléma fontosságát mutatja, hogy a rendelkezésre álló vegyületek mintegy 10-30%-a, az újonnan kifejlesztett molekulák 60-70%-a rossz vízdékonysággal rendelkezik.

Dolgozatunkban bemutatjuk azokat a létező oldékonyságnövelési technikákat, amelyeket parenterális gyógyszerformában alkalmazni lehet a nehézség megoldására. Kitérünk arra, hogy milyen szempontok alapján lehet ezen módszerekből a legmegfelelőbbet választani és milyen további szempontok merülnek fel az oldószerrendszer kidolgozása során. Így többek között bemutatjuk, hogy külön figyelmet kell fordítani az egyes segédanyagok lehetséges hemolizáló hatására, az összetétel pH értékére, a sterilizálhatóságra. Kitérünk arra, hogy az egyes oldékonyságnövelési módszerekre milyen gyógyszer technológiai probléma jellemző, példákat hozunk ezekre, és ahol lehet, a problémák megoldását is bemutatjuk.

### Bevezetés

Régóta ismert az a megállapítás, hogy főként az oldott molekulák hatékonyak – „*Corpora non agunt nisi soluta*”; a rossz oldhatóság hosszú ideje okoz fejtörést az alkimistáknak, a kémikusoknak és a kor előre haladtával a gyógyszerészeknek is [1]. Az oldódás jelentőségére mutatott rá 1863-ban Joseph Carson, a pennsylvaniai egyetem tanára a „*Materia Medica és Gyógyszerészet*” című tárgy előadásainak összefoglalójában, miszerint „minden anyagnak oldott állapotban kell lennie ahhoz, hogy bekerüljön a véráramba”. Beszámolt arról is, hogy bizonyítottan aktív, de nem oldódó anyagok esetén lehetőség van azok oldhatóvá tételére [2].

Ez a mai napig helytálló, hiszen napjainkban az újonnan kifejlesztett hatóanyagok tekintélyes hányada a vízben rosszul oldódó kategóriába tarto-

zik. Ezen gyógyszer molekulák nem megfelelő vízdékonysága komoly nehézséget jelent terápiás felhasználásuk szempontjából és a gyógyszerfejlesztők törekvései ellenére a rossz oldékonyság, valamint ebből adódóan a folyékony gyógyszerformaként történő formulálás nehézségei továbbra is jelentős problémákat okoznak [3, 4]. A Shering AG által 2005-ben megrendezett *Drug Delivery Technologies and Deal Making Summit* rendezvényen közzétett statisztikák szerint:

- minden 10 forgalmazott vegyületből egynél oldékonysági problémák vannak,
- a „pipeline” hatóanyagainak több mint 1/3-a rosszul oldódik,
- a korai preklinikai vizsgálatokból kikerülő hatóanyagok majdnem 2/3-a alacsony oldékonysággal rendelkezik [5, 6].

Ezek a statisztikák egyértelműen alátámasztják



azt a tényt, hogy a gyógyszeriparban egyre nagyobb mértékű a rosszul oldódó vegyületek aránya és ebből adódóan az az igény, hogy ezeket terápiásan alkalmazható oldószerrel/oldószerekkel vagy megfelelő oldékonyság-növelő módszer segítségével terápiásan alkalmazható gyógyszerre kell fejleszteni. Ezen túlmenően, egy meglévő molekula oldékonyságának javítása növeli a hatóanyag biohasznosulását és hatékonyságát, ami természetesen nemcsak tudományos és gyógyászati szempontból releváns, hanem jelentős piaci értéket is teremt. A már ismert hatóanyagokat tartalmazó készítmények átformulálása (ún. szupergenerikus készítményekké) további terápiás lehetőségeket nyithat meg, és a termék szabadalmi védettségét is növelheti. További fontos tény, hogy egy készítmény átformulálása sokkal kevesebb anyagi ráfordítást igényel, mint egy új hatóanyag feltalálása és kifejlesztése [6].

Ebből kifolyólag rosszul oldódó vegyületek folyékony gyógyszerformába történő formulálását számos kutató és fejlesztő megkísérelte és jó néhány módszer vált ismertté a gyógyszertechnológiában [3, 4]. Ezen technikák egy része jól bevált, régóta alkalmazott technika (pl. emulzió, szuszpenzió készítése; oldékonyságnövelés pH, koszulvensek, felületaktív anyagok segítségével), másik része pedig újabb, összetettebb technika (pl. liposzómák vagy mikro- és nanoemulziók készítése). Fontos megemlíteni és tisztázni a különbséget azon technikák között, amelyek az egyes gyógyszer-molekulák látszólagos oldékonyságát növelik, és ezzel a szilárd gyógyszerformák farmakokinetikai tulajdonságait módosítják; illetve amelyek a molekulák valódi, egyensúlyi oldékonyságát változtatják meg. Ez utóbbi módszerek azok, amelyeket folyékony gyógyszerformáknál előnyösen lehet alkalmazni.

Parenterális készítmények esetében, amikor a gyógyszert az emésztőtraktus megkerülésével – injekciók és infúziók esetén többnyire közvetlenül a véráramba történő adagolással – juttatják a szervezetbe, a megfelelő oldékonyság-növelési technika kiválasztása különös odafigyelést igényel. Egyes technikákat csak korlátozottan, másokat pedig egyáltalán nem lehet alkalmazni, mivel parenterális készítmények esetén csak olyan oldékonyság-növelő módszereket lehet választani vagy fejleszteni, amelyek a hatóanyag tulajdonságain túl a szervezet sajátosságait is figyelembe veszik [7].

Munkánk elején röviden bemutatjuk a parenterális gyógyszerformákkal szemben támasztott követelményeket és ismertetjük a gyógyászatban

használt anyagok oldékonysági jellemzőit. Dolgozatunk további célja bemutatni azokat a szempontokat, amelyeket figyelembe kell venni a parenterális gyógyszerformáknál használt oldékonyságnövelési technikák alkalmazása során. Részletezzük, hogy az egyes módszerekre milyen nehézség jellemző, illetve mely szempontokra kell különösen figyelni. Példákat hozunk ezekre, és ahol lehet, a problémák megoldását is bemutatjuk.

### Parenterális gyógyszerkészítmények

A VIII. Magyar Gyógyszerkönyv definíciója szerint a parenterális gyógyszerkészítmények injekció, infúzió vagy implantáció útján az emberi vagy állati testbe juttatásra szánt, steril készítmények [8]. A terápiás szempontok és az alkalmazás módja miatt ezen gyógyszereknek igen szigorú követelményeknek kell megfelelniük. Minden esetben teljesülnie kell a

- sterilitás,
  - pirogénmentesség,
  - pontos hatóanyag-tartalom,
  - fizikai és kémiai stabilitás,
  - szál- ill. részecskementesség
- követelményének.

Optimális esetben a parenterális célra szánt oldatok izotóniásak, izohidriásak és izoioniasak; e három ajánlás azonban ritkán teljesül egyszerre [9, 10]. Ezen követelmények és ajánlások jelentős szerepet játszanak az oldáshoz alkalmazott oldószer vagy oldékonyság-növelő segédanyagok kiválasztásánál.

### Oldatok

Az oldatok két vagy több komponensből álló homogén diszperz rendszerek, ahol az egyes komponensek molekuláris vagy ionos eloszlásban vannak jelen. A diszpergálószer az oldószer, a diszperz fázis pedig az oldott anyag: leggyakrabban szilárd anyag, de lehet folyadék vagy gáz is. Ha az adott anyagból az oldatban adott hőmérsékleten maximálisan oldható mennyiség van feloldva, telített oldatról beszélünk. Ennél kevesebb anyag oldása esetén telítetlen oldatot kapunk. A túltelített oldat nem stabil rendszer, mert a fölöslegben lévő oldott anyag kiválik, az oldat pedig telített lesz. A részecskeméret alapján megkülönböztetünk valódi és kolloid oldatokat: előbbiek esetén az oldott részecskék nagysága kisebb, mint 1 nm, kolloid oldatok esetén pedig 1–1000 nm között van.

I. táblázat

A VIII. Magyar Gyógyszerkönyvben található kifejezések az oldékonyság jellemzésére

Kifejezések	1 g anyagra vonatkoztatott megközelítő oldószertérfogat milliliterben
Nagyon bőségesen oldódik	< 1
Bőségesen oldódik	1 – 10
Oldódik	10 – 30
Mérsékelten oldódik	30 – 100
Kevéssé oldódik	100 – 1000
Alig oldódik	1000 – 10 000
Gyakorlatilag nem oldódik	> 10 000

Oldódáskor az oldott anyag molekulái szolvatálódnak (ha az oldószer víz, ezt a folyamatot hidratációnak nevezik), vagyis lazán kötött oldószermolekulák veszik körül az oldott anyag részecskéit [11]. Előfordul, hogy egy vegyületnek csak egy része (csoportja) szolvatálódik, ilyenkor a molekulában liofil és liofób csoportok is találhatóak. Az oldószerek lehetnek polárisak (pl. víz), szemipolárisak (pl. etanol) és apolárisak (pl. napraforgóolaj). A poláris oldószerek jól oldják a poláris vegyületeket, elektrolitokat. Az apoláris vegyületek vízben gyakorlatilag oldhatatlanok. A szemipoláris oldószerek kismértékben oldják mind a poláris, mind az apoláris vegyületeket. [9]

### Az oldékonyság osztályozása

Az oldékonyság-növelési technikák részletes áttekintése előtt fontos megismerni, hogy milyen esetekben beszélünk rossz vízoldékonyságról, milyen oldékonyság-mutató rendszerek léteznek, és milyen oldékonysági csoportokat ismerünk. A gyógyszervegyületek vagy bármely más molekulák csoportosítását oldékonyság alapján a gyógyszerkönyvek tartalmazzák (mind az európai, mind a hazai gyógyszerkönyv). Az oldékonyság jellemzésére használt kifejezések a 15 – 25 °C közötti hőmérséklettartományra vonatkoznak és leírásukat az I. táblázat foglalja össze.

A gyógyszerkönyv továbbá „részben oldódik” és „elegyedik” kifejezéseket is használ a vegyületek jellemzésére. A „részben oldódik” kifejezés olyan keverékek esetén szerepel, amelyeknek csak egyes alkotórészei oldódnak. Az elegyedik kifejezés olyan folyadékokra vonatkozik, amelyek minden arányban elegyednek a megadott oldószerral [8].

Egyes vegyületek oldékonyság és permeabilitás alapján történő osztályozásának egy másik széles körben alkalmazott módszere a „biopharmaceutical classification system” (biofarmáciai osztályozási rendszer, BCS) szerinti osztályozás. A rendszer 2000-ben már az FDA által kiadott *Guidance for Industry* irányelvben is szerepel, jelezvén széles körű elfogadottságát [12]. Ez a rendszer egyensúlyi oldékonyságuk és intesztinális permeabilitásuk alapján sorolja a vegyületeket négy csoportba (II. táblázat) [13].

Az oldékonyság besorolásának alapja a dózis oldékonysági térfogat (*dose solubility volume*). Ez az a térfogat, ami szükséges a vegyület feloldásához 37 °C-on pH 1,0 – 7,5 között. Amennyiben ez a térfogat ≤ 250 ml, akkor a vegyület jól oldódik, amennyiben > 250 ml, akkor a vegyület rosszul oldódik.

A permeabilitás besorolása az emberi bél hatóanyag abszorpciója alapján kerül meghatározásra. Jó permeabilitású az az anyag, amelynek intesztinális abszorpciója meghaladja a 90%-ot [14].

II. táblázat

BCS osztályozás

	Jó oldékonyság	Rossz oldékonyság
Jó permeabilitás	I. osztály	II. osztály
Rossz permeabilitás	III. osztály	IV. osztály

### Oldékonyságnövelési technikák csoportosítása

Amennyiben egy gyógyszermolekula oldékonysága jóval a terápiás dózis alatt van, számos lehetőség van arra, hogy ezt a szükséges mértékig növeljük. Mint az már a bevezetésben is említésre került, dolgozatunkban kizárólag azokat a módszereket részletezzük, amelyek a gyógyszertechnológiában a parenterálisan alkalmazott készítmények esetén kerülnek felhasználásra, továbbá azon technikák bemutatására szorítkozunk, amelyeknél vizes rendszerben kerül a hatóanyag feloldásra. Ezen technikák közös tulajdonsága, hogy a hatóanyagok egyensúlyi oldékonyságát növelik. Ilyen

– a hatóanyag szerkezetének módosítása

▪ prodrug képzés [15],

▪ sóképzés;

– gyógyszertechnológiai módszerek

▪ pH-változtatás [16, 17],

▪ koszolvensek alkalmazása [18],

▪ felületaktív anyagok hozzáadása [19],

▪ hidrotrop képzés [20, 21],

▪ ciklodextrin zárványkomplexek kialakítása [22, 23],

▪ liposzóma-előállítás [24, 25].

A felsorolt módszerek mindegyike alkalmas oldékonyságnövelésre, azonban a célnak

legmegfelelőbb technika kiválasztása során számos tényezőt kell figyelembe venni. A két legfontosabb ezek közül (1) a hatóanyag tulajdonságai és (2) a parenterális adagolásból adódó speciális szempontok.

### Hatóanyag tulajdonságai

Mivel jelen dolgozatban a parenterális adagolásra szánt készítményekben alkalmazható módszereket kívánjuk részletesen bemutatni, ezért a hatóanyag elemzéséhez csak egy rövid listát készítettünk (III. táblázat), és a gyógyszerforma sajátosságaiból adódó nehézségeket mutatjuk be részletesen. Ez természetesen nem azt jelenti, hogy a farmakon tulajdonságai másodlagosak az oldékonyságnövelési technika kiválasztásánál, sőt fordítva, ezek a módszer kiválasztásának elsődleges meghatározói, hiszen a vegyület pKa értéke, vízdékonysága és lipofilitása határozzák meg leginkább a technika alkalmazhatóságát.

### Gyógyszerforma-specifikus problémák

A hatóanyag-tulajdonságok bemutatása után célszerű a rendelkezésre álló oldékonyságnövelési technikák áttekintése és az adott farmakonra leginkább alkalmazható kiválasztása. Ehhez szükséges ezen technikák előnyeinek és hátrányainak, valamint a gyógyszerforma sajátosságaiból adódó technológiai és biológiai tulajdonságainak részletes ismerete (III. táblázat).

#### Sterilitás biztosítása

A parenterális gyógyszerformákkal szemben támasztott egyik követelmény, hogy a készítmény steril legyen. Ennek megvalósítására a két leggyakrabban alkalmazott módszer a hősterilizálás és a membránszűrés (a többi technika ritkábban kerül alkalmazásra).

Amennyiben a hővel történő végsterilizáláshoz az autoklávozást választjuk, abban az esetben túlnyomás alatt, telített vízgőzben legalább 15 percig 121°C-on kell a készítményt tartani. Végsterilizálás során a magas hőmérsékletnek kitett mintákban elpusztulnak a patogén és az apatogén mikroorganizmusok, azonban ezzel párhuzamosan a hőhatásnak köszönhetően nem kívánt változásokkal is számolni kell. Ezek közül a legszembetűnőbb a hatóanyag és/vagy a segédanyagok bomlása.

A számos hőérzékeny vegyületen túl a prodrug képzés során a jobb vízdékonysági tulajdonság-

#### III. táblázat

A megfelelő oldékonyságnövelési technika kiválasztásához szükséges, a hatóanyagok tulajdonságát leíró adatok, valamint a gyógyszerformára jellemző specifikus problémák

#### Hatóanyag elemzése

- alkalmazott dózis,
- szerkezeti jellemzők,
- olvadáspont,
- víz-oktanol megoszlási hányados,
- ionizációs konstans,
- vízdékonyság,
- stabilitása különböző közegekben (pH, koszolvens stb.),
- permeabilitás;

#### Gyógyszerforma-specifikus problémák

- sterilitás biztosítása,
- hatóanyag stabilitása adott segédanyagok jelenlétében,
- hatóanyag lehetséges kiválása hígítás hatására,
- oldószerrendszer viszkozitása és adagolhatósága (injektálhatósága),
- phlebitis,
- haemolysis és sejtkárosodás,
- fájdalom a beadás helyén,
- toxicitás.

gal rendelkező hatóanyagok sok esetben metastabil vegyületek. Hő hatására a prodrug elbomlik és az eredeti, kiindulási hatóanyag keletkezik, amelynek oldékonysága rendszerint alacsonyabb; ebből kifolyólag kicsapódik. Amennyiben a *prodrug-képzést* választjuk az oldékonyság-növelésre, az esetek döntő hányadában csak a membránszűrés alkalmazható a készítmény sterilizálására [15].

A *nanonizálás és a liposzómába történő formulálás* térhódítása egyre nagyobb méreteket ölt a gyógyszeriparban. A liposzómás készítmények hősterilizálhatósága azonban szintén nem valószínűsíthető meg, mert magas hőmérsékleten a lipidek és a liposzómák struktúrája is instabil. Ebből kifolyólag ezen technika esetén is csak a membránszűrés választható [14].

Membránszűrés esetén az oldatokat 0,22 µm-es vagy ennél kisebb névleges pórusátmérőjű, baktérium-visszatartó membránon kell szűrni. Mivel ezen szűrők felépítése és anyaguk is nagyon sokféle lehet, ezért itt arra kell ügyelni, hogy az anyagnak a szűrőn történő esetleges adszorpcióját elkerüljük [8]. Ennek kiküszöbölésére, valamint azért, hogy a szűrő és az oldószer kompatibilitása megállapításra kerüljön, a szűrőgyártók rendszeresen készítenek kompatibilitás-vizsgálatokat és ezeket katalógusaikban közzé is teszik [26]. Vizsgálataik során számos savat, bázist és koszolvenst ellenőriznek. A megfelelő szűrő kiválasztásánál azonban az elkészült oldószerrendszerrel kell megfelelő kompatibilitási vizsgálatokat végezni a fejlesztés során, hogy a használható szűrők azonosításra kerüljenek.

#### *A hatóanyag stabilitása különböző oldószerekben*

A hatóanyag stabilitása különböző oldószerekben nem specifikusan parenterális gyógyszerformához fűződő probléma, hanem általánosan jelen van a folyékony gyógyszerformákban, azonban az oldékonyságnövelési technikák megválasztásának egy nagyon lényeges pontja. A vegyületek vizes közegben történő bomlásának számos formája ismert, melyek közül a hidrolízis és a redoxi folyamatok a leggyakoribbak. Az oldékonyság-növelésre kiválasztott technika stabilizáló vagy destabilizáló hatása nagyrészt a farmakon bomlási mechanizmusának függvénye.

**Hidrolízis:** Az oldékonyság-növeléshez használt segédanyagok jelentősen befolyásolhatják a hatóanyag kémiai stabilitását, hiszen ezek a tiszta víztől és a szilárd állapottól eltérő környezetet biztosítanak [18]. Az oldóközegben a pH, az ionerősség, a

puffer minősége és a kezdeti koncentráció nagymértékben befolyásolja a hatóanyagok stabilitását [14]. Számos jól ismert és alkalmazott vegyület hidrolizál, mint pl. a diazepam, aszpirin, ketokonazol stb. [18]. A ketokonazol esetén a vizsgálatok rámutattak arra, hogy a hatóanyag stabilitása pH 5 alatt hosszú távon nem megfelelő [27]. Azonban a megfelelő stabilitást nemcsak a hatóanyag kémiai bomlása ronthatja el, hanem a gyakran figyelmen kívül hagyott segédanyagok reakciója is. *Hirakura* munkája mutatott rá arra, hogy bizonyos készítmények pH-ja tárolás hatására megváltozik. Egy rosszul oldódó vegyület, pl. a conivaptan-hidroklorid esetén a hatóanyagot tejsav és etanol / propilén-glikol oldószerben feloldva, rendszer kezdetben pH 4 – 5 közé beállított kémhatása a tárolás során, hosszú távon nő, ami a tejsav dimerek hidrolízise és az alkoholokkal történő észterképzés miatt következik be [28].

Hasonló folyamatok figyelhetők meg koszolvensek, micellák és komplexálók esetén is. *Zhao* és *Yalkowsky* munkássága során az eptifibatid stabilitását sikerült koszolvensek hozzáadásával javítani [29]. A koszolvensekhez hasonló stabilizáló hatást kifejtő micellák, komplexálók és a liposzómák is ilyen elven működve csökkentik a farmakon-víz találkozásának arányát és így csökkentik a hidrolízis valószínűségét.

**Oxidáció:** Pufferek és pH beállítók esetén nehéz általános következtetést levonni az oxidációra tett hatásukról; ebben az esetben a farmakon tulajdonságai határozzák meg azt a pH tartományt, amiben a legstabilabb. Általánosságban azonban elmondható, hogy az oxigén apoláris vegyületként jobban oldódik az apoláris oldószerben, tehát sók hozzáadása révén csökkenthető az oldott oxigén mennyisége. Koszolvensekkel történő formulálás esetén az oldószerrendszer apolárisabb lesz és így több oxigént képes oldani, ami az oxidációs folyamatok felgyorsulását segítheti. Micelláris szolubilizálás esetén, csakúgy mint a hidrolízisre hajlamos vegyületek oldása során, a stabilizálás/destabilizálás mértéke attól függ, hogy az oldott hatóanyag milyen módon helyezkedik el a micellában. Abban az esetben, ha védve van az oxigéntől, akkor stabilizáló hatás érvényesül, pl. metilprednizolon polisorbát 80-ba történő oldása esetén [18].

Természetesen az irodalomban döntő többségben olyan közlemények találhatók, amelyek arról szólnak, hogy az egyes segédanyagok stabilizáló hatást fejtenek ki, azonban találni példát ennek ellenkezőjére is. *Kamiya* és munkatársai paraoxon, paration és metil-paration hidrolízisének sebesség-



gét vizsgálták meg három különböző ciklodextrin-nel komplexálva. Eredményeik rámutattak arra, hogy a paration hidrolízisének sebessége jelentősen megnő a komplexálás hatására [30].

Prodrug képzése, ellentétben az eddig felsoroltakkal, számos stabilitási problémát vet fel. Ebben az esetben nem a hatóanyag kémiai bomlása jelenti a fő akadályt, hanem hasonlóan a sterilizálási részben leírtakhoz, tárolás során a prodrugból kialakulhat az eredeti hatóanyag, melynek oldékonysága rosszabb és így az kiválhat az oldatból [15].

Liposzómás formulálás esetén a hatóanyag stabilitásának vizsgálatán túl nagyon fontos a liposzóma fizikai és kémiai stabilitásának ismerete. Olyan fizikai paraméterek, mint például a liposzómák méreteloszlása és a bezárási hatásfok változhatnak tárolás hatására, így nagyon jelentős befolyásuk lehet a készítmény stabilitására [14]. *Noda* és munkatársai a 6-karboxil-fluoreszcinnel végzett vizsgálataik során bebizonyították, hogy a koleszterin tartalmú liposzómákból lassabban szivárog ki a vizsgált anyag [31]. A liposzómák fizikai stabilitásán túl a legfontosabb kémiai bomlásuk a foszfolipideket érintő hidrolízis és oxidáció. Hidrolízis során a keletkezett zsírsavak csökkentik a pH-t, tehát a pH monitorozása szükséges. Ezen kívül a keletkezett lizofoszfátidok megnövelik a membrán fluiditását és permeabilitását, ami a hatóanyag kiszivárgásához vezet. Oxidáció során keletkezett szabad gyökök, aldehidek és egyéb vegyületek hasonló módon a liposzóma kettősréteg fluiditását, permeabilitását és a bezárási hatásfokát ronthatják [14].

Összegezve elmondható, hogy az alkalmazott oldékonyság-növelési technikák közül egyes esetekben homogén keverék (koszolvens, pH beállítók) keletkezik, míg más esetekben nem. Azon oldatok esetén, ahol homogén keverék keletkezik, az oldószerrendszer polaritása az azt alkotók polaritása közé esik. Az így keletkezett rendszer polaritása jelentős hatással van az oldandó anyag stabilitására, hiszen az egyes kémiai reakciók előfordulásának valószínűsége eltérő lehet a különböző összetételű (ebből kifolyólag különböző polaritású) oldószerekben. Erre példa a polaritás csökkentése, amely gátat szab az ionizált forma keletkezésének, így azoknak a bomlási folyamatoknak, amelyek során vagy végén töltött részecské jön létre. Azokban az oldatokban, ahol nem homogén keverék keletkezik, ilyen általános megállapítást nem lehet tenni és ott a stabilitás vagy instabilitás kialakuláshoz egyéb tényezők is hozzájárulnak [18].

#### *Hatóanyag lehetséges kiválása hígítás hatására*

A parenterális gyógyszeradagolás sajátossága, hogy bizonyos esetekben a készítményt beadás előtt más oldatokkal (pl. infúzió) elegyíthetik. Amennyiben pH beállítással, koszolvenssekkkel, felületaktív anyagokkal, komplexképzőkkel, vagy ezen technikák valamilyen kombinációjával kísérjük meg a kívánt oldékonyságot biztosítani, úgy számolni kell azzal a lehetőséggel, hogy a kidolgozott összetételben a hatóanyag hígítás hatására kiválhat. A hígítás történhet infúziókkal vagy vérrel (a készítmény beadása). Mindkét esetben ugyanaz a folyamat zajlik le: adott egy összetétel, melyben adott koncentrációban lehet a farmakont feloldani. Hígítás után egy új összetétel keletkezik, melyben a hatóanyag és a segédanyagok koncentrációja, továbbá adott esetben a pH-ja is eltér az eredeti összetételtől. Amennyiben ez a kialakult rendszer nem képes a hatóanyagokat oldatban tartani, a farmakon kiválhat. Az alábbiakban részletesen bemutatjuk az egyes oldékonyság-növelési technikák során tapasztalható hatóanyag-kiválás lehetséges okait.

Savakkal, lúgokkal és egyéb pH beállítókkal végzett oldékonyság-növelés esetén a hígítás hatására végbemenő folyamatok több tényezőtől függenek. Ilyen tényező:

- a kiindulási oldat pH-ja,
- a kiindulási oldat puffer kapacitása,
- a hígító oldat pH-ja,
- a hígító oldat puffer kapacitása.

Mindezen tényezők erősen befolyásolják azt a folyamatot, amely során a hígított oldat pH-ja, az oldott anyag koncentrációja és ebből kifolyólag az oldékonysága változik. Összefoglalva a hígításkor végbemenő folyamatok eredményét elmondható, hogy amennyiben a hígítás utáni oldat pH-ja olyan mértékben változik, hogy az a gyógyszermolekula oldékonyságának szempontjából előnytelen, abban az esetben megtörténhet a vegyület kiválása az oldatból. Az ilyen rendszerből természetesen nem válik ki az összes hatóanyag, csak az a mennyiség, amit a hígított oldat már nem tud oldatban tartani. Így egy új egyensúly áll be a hígított oldat és az oldatban maradt hatóanyag között [18]. A hatóanyag kiválására a forgalomba került készítmények között is találhatunk példát: bizonyos fenitoin tartalmú összetételekben a hatóanyag szabad bázisként válik ki hígítás hatására [32]. *Alvarez-Núñez* a jelenség megoldására a pufferkapacitás növelését javasolta, amivel megoldhatóvá vált a készítmény hígítása kicsapódás nélkül [33]. További vizsgálá-

tok trimetoprim és szulfametoxazol, levemopamil-hidroklorid és dexverapamil-hidroklorid hígításkor végbemenő kicsapódásáról számolnak be [34, 35].

Mint ahogyan a pH beállítással történő oldékonyság-növelés esetén is előfordul, a koszolvensek alkalmazásakor is fontos tényező a hígítás hatására esetlegesen végbemenő hatóanyag-kiválási folyamatok megismerése. Mint azt korábban már említettük, ez a jelenség két esetben érdemel figyelmet: vérrel történő hígítás (beadás) és infúzióval történő beadás esetén. Az első esetben általában kis mennyiségű oldószer és hatóanyag kerül adagolásra (injekció). Amennyiben a beadás pillanatában a vérárammal felhígul a beadott oldat és az így kialakult közeg már nem képes a hatóanyagot oldatban tartani, abban az esetben az kiválik, és sejtkárosodást okozhat. *Yalkowsky* és munkatársai bebizonyították, hogy az injektálás sebessége jelentős befolyással van az esetleges kicsapódásra. Munkájukban részletesen bemutatták, hogy a gyors injektálás kisebb mértékű hígulást eredményez, mint a lassú injektálás, ezért az előbbi esetet javasolják a hatóanyag kicsapódásának elkerülésére [36, 37, 38, 39, 40]. A második esetben az infúziókkal történő elegyítés során (additív képzés) általánosan elfogadott követelmény, hogy az így kialakított rendszerek 24 órán keresztül stabilak maradjanak. Ehhez sok esetben nagyobb mennyiségű koszolvens alkalmazása szükséges, mint azt az oldékonyságjavító hatás megkívánná, hiszen ezekben a rendszerekben akár 50-szeres hígítás is előfordulhat.

Annak ellenére, hogy a felületaktív anyagok használatánál is fennáll a hatóanyag kiválásának lehetősége hígítás hatására, ennek a valószínűsége kisebb, mint a pH beállítókkal vagy a koszolvensekkel történő oldékonyság-növelés esetén. A véráramban vagy infúziókkal történő hígítás során az esetlegesen kiváló hatóanyag helyi reakciót válthat ki [41]. Ennek megakadályozására úgy kell megválasztani a felületaktív anyag mennyiségét, hogy az még a hígítás után is oldatban tudja tartani a kívánt mennyiségű hatóanyagot. *Alvarez Núñez* és *Yalkowsky* különböző diazepam formulációk vizsgálata során jutottak arra a megállapításra, hogy kevert micellák alkalmazása csökkenti a hatóanyag kicsapódásának valószínűségét [33].

Ciklodextrinnel történő formulálás során a farmakon kicsapódásának valószínűsége a legkisebb az eddig felsoroltak közül, hiszen ebben az esetben ritkán fordul elő az oldat túltelítődése. Ciklodextrinnel történő oldékonyság-növelés esetén a szubsztrát és a ciklodextrin különböző arány-

ban képeznek komplexet. Abban az esetben, amikor a ciklodextrin-hatóanyag komplex aránya 1:1, nem következik be kiválás, egyéb arányoknál, vagy ha egy másik jelen lévő molekula képes komplexbe lépni, előfordulhat kiválás [42].

A liposzómás készítmények a legtöbb esetben liofilizált termék formájában kerülnek forgalomba. Ezeket a készítményeket beadás előtt fel kell oldani és csak utána lehet hígítani. Kiválás nem valószínű, mert a liposzómák olyan módon készülnek, hogy a bennük lévő folyadék izotóniás és izohidriás, és a hígításhoz használt infúziók (pl.: 5%-os glükóz infúzió) is izotóniásak. Abban az esetben, ha nem izotóniás oldattal történik a hígítás, akkor a liposzóma roncsolódik: megduzzad vagy összezsugorodik attól függően, hogy milyen a környezet sótartalma; ez természetesen hatóanyag-kiváláshoz vezethet.

Annak ellenére, hogy az esetek döntő többségében a hígítás 5%-os glükóz vagy 0,9%-os nátriumklorid infúziókkal történik, nem lehet figyelmen kívül hagyni az egyéb készítményekkel történő elegyítés hatását sem. *Trissel* részletesen elemzi az USA-ban forgalomban lévő készítmények különböző infúziókkal történő hígításának hatását, kompatibilitásukat additív képzés során, fecskendőkben, valamint Y-elágazásban történő adagolásukkor [43]. Hasonló elegyíthetőségi és kompatibilitási információkat tartalmaz *Higyisán* és *Szabó* munkája, amely a hazai forgalomban lévő készítmények hígítás hatására jelentkező kompatibilitási/inkompatibilitási jelenségeit részletezi [44]. Ezen irodalmakat felhasználva számos olyan fontos információ kerül a fejlesztő kezébe, amelyek segítségével az esetleges hatóanyag-kiválást előre tudja jelezni. Az előzőeken túlmenően a hígítás során jelentkező folyamatokat különböző módszerek segítségével is meg lehet vizsgálni. Mind statikus, mind dinamikus módszerek léteznek, amelyek közös tulajdonsága, hogy a kidolgozott összetételeket nagyobb mennyiségű oldatokhoz adják. Statikus vizsgálatok esetén az összetétel egy meghatározott térfogatát elegyítik egy adott térfogatú infúzióval. Amennyiben nincs hatóanyag-kiválás, abban az esetben ennek az elegynek egy meghatározott mennyiségét tovább hígítják, mindaddig, amíg a kicsapódás meg nem jelenik. Dinamikus vizsgálat esetén az ismert térfogatú összetételt áramlásban lévő folyadékhoz injektálják és az esetleges hatóanyag-kiválást turbidimetrián mérlik [45].

A hígítás hatására bekövetkező hatóanyag-kiválásról összegezve elmondható, hogy a parenterális gyógyszerfejlesztés egyik fontos szempontja.

Amennyiben a rossz vízdékonyságú hatóanyagokat a fent említett módszerek segítségével szolubilizáljuk, minden esetben célszerű a hígítás hatását megvizsgálni.

A jelenség megismerése mellett, annak megakadályozására is több megoldás létezik. Ilyen például az infúzió/injekció adagolási sebességének megváltoztatása, nagyobb pufferkapacitás biztosítása, vagy a farmakon koncentrációjának csökkentése.

*Oldószerrendszer viszkozitása és adagolhatósága (injektálhatósága)*

Egyes esetekben az oldékonyság-növeléshez használt segédanyagokból olyan nagy mennyiség kerül felhasználásra, hogy az az oldószer viszkozitását és ebből kifolyólag az injektálhatóságát is befolyásolhatja. Ez nagyon ritkán fordul elő és vizsgálata nagyon egyszerű: egy tűből történő kinyomás során megfigyelhető. Nagy viszkozitással rendelkező segédanyagok pl. propilénglikol vagy PEG viszkozitása etanollal csökkenthető. Az irodalomban számos egyéb találmány és szabadalom foglalkozik egyes készítmények injektálhatóságának a javításával. Például Kim és Ryoo munkájuk során szoma-

totropin tartalmú készítményt szabadalmaztattak, amelyben szintén alkoholszármazékokkal javították annak injektálhatóságát [46, 47]. Nagy koncentrációban alkalmazott segédanyagok (pl. ciklodextrin) esetén felmerülhet az injektálhatósági probléma. Ez utóbbi segédanyag származékának, a hidroxipropil-ciklodextrinnek a 20%-os oldata még jól injektálható [18].

*Toxicitás*

Az egyes oldékonyság-növelő segédanyagok toxicitása különböző formában jelentkezhet. Jellemző a parenterális gyógyszerformáknál a beadás helyén fellépő gyulladás, hemolízis és a phlebitis, amely jelenségek néha a hatóanyag tulajdonságaival magyarázhatóak. Ebben az esetben az összetétel változtatása nem javít a helyzeten, azonban ha a fenti jelenséget nem a hatóanyag váltja ki, akkor a megfelelő gyógyszer technológiai lépések megvalósításával ezek enyhíthetők.

Oldékonyság-növelésként pH korrigenseket alkalmazva, a szervezet pufferkapacitásának túróképességét kell figyelembe venni. Általában a pH 3 és 8 közötti érték esetén a szervezet még jól tolerálja a

*IV. táblázat*

*Különböző összetételű koszolvens rendszerek és azok esetleges károsító hatásai*

Oldószerrendszer	pH	Dózis (ml/kg)	Infúzió-beadás sebessége (ml/perc)	Faj	Perivaszkuláris irritáció / <i>in vivo</i> hemolízis
Propilénglikol 15% NaCl 1,8% Víz	5-7,4	2,5	3	patkány	nincs irritáció nincs hemolízis
Propilénglikol 15% Etanol 12% PEG 400 20% Víz	5-7,4	2,5	3	patkány	enyhe irritáció nincs hemolízis
Etanol 10% PEG 400 40% Víz	5-7,4	2,5	3	patkány	nagyon enyhe irritáció enyhe hemolízis
Propilénglikol 50% Etanol 10% Víz	-	5,0	0,3	patkány	sejtnekrózis a beadás helyén enyhe hemolízis
Propilénglikol 40% Etanol 10% Acetát puffer	5-7,4	2,5	3	patkány	számottevő irritáció számottevő hemolízis

Forrás: [48, 49]

beadott oldatot. Ettől eltérő kémhatásnál már szövétkárosodás és az ebből adódó fájdalom jelentkezhet.

A koszolvenszek kiválasztásánál az egyik döntő szempont a toxicitásuk. Számos segédanyag alkalmazható, azonban még itt is felmerül egy megoldatlan probléma: a parenterális gyógyszerformákban nincs előírva az adott vegyületek maximálisan megengedett koncentrációja. A IV. táblázatban látható, hogy a forgalomban lévő készítményekben az alacsony koncentrációtól a magas koncentrációig terjed a különböző koszolvenszek alkalmazása. Létezik azonban néhány támpont, amely alapján meghatározható a felhasznált mennyiségük:

- a beadás módja,
- összdózis,
- betegpopuláció,
- a terápia ideje.

Természetesen a legmegbízhatóbb információt a toxicitás-vizsgálatok jelentik. A IV. táblázatban néhány *in-vivo* toxicitás-vizsgálat eredményét foglaltuk össze.

További cikkek foglalkoznak koszolvenszek mellékhatásai és toxicitásuk részletezésével [50, 51, 52, 53]. Számos esetben phlebitisről, hemolízisről és a beadás helyén fellépő fájdalomról számolnak be [54], továbbá intramuszkuláris adagolás esetén miototoxicitásról írnak [55].

A felületaktív anyagok toxicitása főleg hemolizáló és T-limfocita sejt pusztító hatásukon alapul. Hemolizáló hatásuk révén nagy mennyiségű hemoglobin szabadul fel, aminek toxikus hatása van. A T-limfocita sejt károsítása révén hisztamin felszabadulás tapasztalható, ami akár anafilaxiás sokkhoz is vezethet [56]. Bár az ionos felületaktív anyagok toxikusabbak a nem-ionosoknál, mégis ez utóbbiak ismerete is rendkívül fontos, hiszen a nem-ionos anyagok kerülnek alkalmazásra parenterális gyógyszerformákban. Számos tanulmány részletezi a felületaktív anyagok kontakt ideje, minősége és koncentrációja, valamint a kiváltott hemolizáló hatás közötti összefüggést [57, 58, 59]. Ezen publikációk, valamint a forgalomban lévő készítményekből szerzett tapasztalat révén lehet az egyes segédanyagok toxicitását értékelni és ennek megfelelően alkalmazni parenterális gyógyszerformában.

Külön említést érdemel a Cremophor EL nevű nem-ionos felületaktív anyag, amelyet több forgalomban lévő készítményben is alkalmaztak. Többek között mikonazol és paklitaxel oldékonyságának javítására használták. A segédanyag azonban számos olyan mellékhatást eredményezett, ami mi-

att alkalmazása egyre inkább háttérbe szorult [60]. Lilley és Scott a segédanyag által kiváltott túlérzékenységi reakcióról írnak, amely során nefrotoxicitás, vazodilatáció és letargia volt megfigyelhető [61]. A Cremophor EL anafilaxiás sokkot is okoz, amelyről bebizonyosodott, hogy a hisztamin-fel szabadulás idézi elő [62].

Ciklodextrinek parenterális alkalmazása esetén szintén számolni lehet a hemolízissel. Mivel nagy koncentrációban kerülnek felhasználásra oldékonyságnövelés céljából, azok a sejtmembránból egyes komponenseket kioldhatnak (koleszterin, fehérje, foszfolipid) és ezáltal rongálhatják a sejtet. A ciklodextrinek fő toxicitási problémáját a vesetoxicitásuk jelentette, amelyet azonban az újabb, módosított CD-k bevezetésével sikerült jelentősen csökkenteni [18].

### Összefoglalás

Dolgozatunkban bemutattuk a parenterális gyógyszerformákkal szemben támasztott követelményeket, az oldatok általános tulajdonságait és az egyes oldékonyságnövelési technikákat. Munkánkban azokat a módszereket soroltuk fel, amelyek vizes alapú rendszert biztosítanak parenterálisan alkalmazható készítményekhez. Ezt követően részleteztük az egyes technikák nehézségeit és azokat a fejlesztési szempontokat, amelyekre külön figyelmet kell fordítani. Az egyes problémákat külön fejezetként tárgyalva kitértünk arra, hogy mely javasolt oldékonyságnövelési technikák esetén kell az adott kérdéssel foglalkozni. Végezetül az egyes részekben kísérletek és irodalmi adatok alapján a felmerülő problémákra megoldási lehetőségeket is vázoltunk.

### IRODALOM

1. Seijas, J.A., Vázquez-Tato, M.P.: Microwaves: a new tool for an ancient element, Chem. Today, 25, 20-24 (2007).
2. Carson, J.: Synopsis of the course of lectures on Materia Medica and Pharmacy. Philadelphia: Blanchard and Lea, 1863, p.22.
3. Kovács, K., Stampf, Gy., Klebovich, I., Antal, I., Ludányi, K.: Eur. J. Pharm. Sci. 36, 352-358 (2009)
4. 61/041930 számú USA-beli ideiglenes szabadalmi bejelentés (2008)
5. Prentis, R.A., Lis, Y., Walker, S.R.: Br. J. Clin. Pharmacol. 25, 387-396 (1998)
6. Weschke, F.: Project Evaluation, Solvent System Project, (2008\_002 Miconazole solubility enhancement project) GIBBS, 2008.
7. Rác, I., Selmeczi, B.: Gyógyszer-technológia. Medicina Könyvkiadó, Budapest, 1992.



8. Magyar Gyógyszerkönyv VIII. kiadás. Medicina Könyvkiadó, Budapest, 2003.
9. Kedvessy, Gy.: Gyógyszer-technológia. Medicina, Budapest, 1978.
10. Stampf, Gy., Nikolics, M., Kovács, K., Antal, I., Klebovich, I.: Parenterális gyógyszerformák és készítmények. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2007.
11. Csóka, G., Marton, S., Budai, M., Antal, I., Klebovich, I.: A gyógyszer-technológia fizikai ellenőrző vizsgálatai. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2008.
12. Food and Drug Administration CDER, Guidance for industry: waiver of *in vivo* bioavailability and bioequivalence studies for immediate release solid oral dosage forms based on biopharmaceutics classification system, 2000.
13. Amidon, G.L., Lennernaes, H., Shah, V.P., Crison, J.R.: Pharm.Res. 12, 413-420 (1995)
14. Liu, R.: Water-Insoluble Drug Formulation, 2nd Ed, CRC Press, Suite, NW and Boca Raton, FL, 2008.
15. Stella, V.J., Nti-Addae, K.W.: Adv. Drug Deliv. Rev. 59, 677-694 (2007)
16. Bhattachar, S.N., Deschenes, L.A., Wesley, J.A.: Drug Discov. Today 11, 1012-1018 (2006)
17. Avdeef, A.: Adv. Drug Deliv. Rev. 59, 568-590 (2007)
18. Yalkowsky, S.H.: Solubility and Solubilization in Aqueous Media. Oxford University Press, New York, New York, 1999.
19. Malmsten, M.: Surfactants and Polymers. In: Drug Delivery. Marcel Dekker, 2002.
20. Coffman, R.E., Kildsig, D.O.: Pharm. Res. 13, 1460-1463 (1996)
21. Agrawal, S., Pancholi, S.S., Jain, N.K., Agrawal, G.P.: Int. J. Pharm. 274, 149-155 (2004)
22. Loftsson, T., Duchêne, D.: Int. J. Pharm. 329, 1-11 (2007)
23. Brewster, M.E., Loftsson, T.: Adv. Drug Deliv. Rev. 59(7), 645-666 (2007)
24. Langner, M., Kral, T.E.: Pol. J. Pharamacol. 51, 211-222 (1999)
25. Klipp, J.E.: Int. J. Pharm. 284, 109-122 (2004)
26. Sartorius laboratory product catalogue, Sartorius AG, Weender Landstrasse 94-108, 37075 Goettingen, Germany
27. Skiba, M., Skiba-Lahiani, M., Marchais, H., Duclos, R., Arnaud, P.: Int. J. Pharm. 198, 1-6 (2000)
28. Hirakura, Y., Nakamura, M., Wakasawa, T., Ban, K., Yokota, S., Kitamura, S.: Int. J. Pharm. 325, 26-38 (2006)
29. Zhao, L., Yalkowsky, S.H.: Int. J. Pharm. 218, 43-56 (2001)
30. Kamiya, M., Mitssuhashi, S., Makino, M.: Chemosphere 12, 1783-1796 (1992)
31. Noda, H., Huroono, M., Ohishi, N., Yagi, K.: Biochim. Biophys. Acta. 1153, 127-131 (1993)
32. Surakitbanharn, Y., Simamora, P., Ward, G.H., Yalkowsky, S.H.: Int. J. Pharm. 109, 27-33 (1994)
33. Alvarez-Núñez, F.A., Yalkowsky, S.H.: Int. J. Pharm. 185, 45-49 (1999)
34. Myrdal, P.B., Simamora, P., Surakitbanharn, Y., Yalkowsky, S.H.: J. Pharm. Sci. 84, 849-852 (1995)
35. McDonald, C., Faridah, S.: J. Parenteral Sci. Technol. 45, 147-152 (1991)
36. Li, P., Vishnuvajjala, R., Tabibi, S.E., Yalkowsky, S.H.: J. Pharm. Sci. 87(2), 196-199 (2000)
37. Narazaki, R., Sanghvi, R., Yalkowsky, S.H.: Chem. Pharm. Bull. 55(8), 1203-1206 (2007)
38. Wu, Z., Tucker, I.G., Razzak, M., Medlicott, N.J.: Int. J. Pharm. 304, 1-3 (2005)
39. Yalkowsky, S.H., Valvani, S.C., Johnson, B.W.: J. Pharm. Sci. 72(9), 1014-1017 (1983)
40. Johnson, J.L.H., He, Y., Yalkowsky, S.H.: J Pharm Sci. 92, 1574-1581 (2003)
41. Yalkowsky, S.H., Krzyzaniak, J.F., Ward, G.H.: J. Pharm. Sci. 87, 787-796 (2000)
42. Rajewski, R.A., Stella, V.J.: J. Pharm. Sci. 85, 1142-1169 (1996)
43. Trissel, L.A.: Handbook of injectable drugs 10th edition. American society of health-system pharmacists, Houston, 1998.
44. Higysán, I., Szabó, Cs.: Injekciók elegyíthetősége infúziókkal. Magyar Gyógyszerészeti Társaság, Budapest, 2002.
45. Li, P., Vishnuvajjala, R., Tabibi, S.E., Yalkowsky, S.H.: J. Pharm. Sci. 87, 196-199 (2000)
46. US Pat. 4 332 796 (1980)
47. US Pat. 6 733 786 (2001)
48. Fu, R.C.-C., Lidgate, D.M., Whatley, J.L., McCullough, T.: J. Parenter. Sci. Technol. 41, 164-168 (1987)
49. Fort, F.L., Heyman, I.A., Kesterson, J.W.: J. Parenter. Sci. Technol. 38, 82-87 (1984)
50. „Final report on the safety assesment of propylene glycol and polypropylene glycols”. J. Am. Coll. Toxicol. 13, 437-439 (1994)
51. „Final report on the safety assesment of polyethylene glycols (PEGs)-6, -8, -32, -75, -150, -14M, -20M”. J. Am. Coll. Toxicol. 12, 429-457 (1993)
52. Medlicott, N.J., Foster, K.A., Audus, K.L., Gupta, S., Stella, V.J.: J. Pharm. Sci. 87, 1138-1143 (1998)
53. Lamas, M.C., Villaggi, L., Nocito, I., Bassani, G., Leonardi, D., Pascutti, F., Serra, E., Salomon, C.J.: Int. J. Pharm. 307, 239-243 (2006)
54. Krzyzaniak, J.F., Raymond, D.M., Yalkowsky, S.H.: Int. J. Pharm. 152, 193-200 (1997)
55. Amin, K., Dannenfelser, R.M.: J. Pharm. Sci. 95(6), 1173-1176 (2006)
56. Shalel, S., Streichman, S., Marmur, A.: J. Coll. Interf. Sci. 252, 66-76 (2002)
57. Lowe, K., Furmidge, B., Thomas, S.: Artif.Cells, Blood Substitutes, Immobilization Biotechnol. 23, 135-139 (1995)
58. Riess, J.G., Pace, S., Zarif, L.: Adv. Mater. 3, 249-251 (1991)
59. Al-Assadi, H., Baillie, A.J., Florence, A.T.: Int. J. Pharm. 53, 161 (1989)
60. Gelderblom, H., Verweij, J., Nooter, K., Sparreboom, A.: Eur. J. Cancer. 37, 1590-1598 (2001)
61. Lilley, L.L., Scott, H.B.: Am. J. Nurs. 93, 46-50 (1993)
62. Weiss, R.B., Donehower, R.C., Wiernik, P.H.: J. Clin. Oncol. 8, 1263-1268 (1990).

[Érkezett: 2009. március 16.]

## Szerzői útmutató

Az *Acta Pharmaceutica Hungarica* a gyógyszerészeti tudományok területéről közöl eredeti, kísérletes kutatómunka eredményeit bemutató közleményeket, de fórumot biztosít összefoglaló és nem kísérletes (történeti, szervezési) tanulmányok, valamint Ph.D. és D.Sc. értekezések téziseinek közlésére is.

Hazai kutatóhelyek vagy olyan szerzői kollektívák magyar nyelvű kéziratait közöljük, ahol az első szerző magyar. Lehetőség van külföldi folyóiratban már megjelent, kiemelkedő jelentőségű közlemények magyar nyelvű változatának közlésére is, az első megjelenés időpontjától számított egy éven belül, az első közlés bibliográfiai adatainak megjelölésével.

### Közlésre elfogadjuk:

1. Összefoglaló közleményeket, legfeljebb 25 gépelt oldal terjedelemben. Ezek megírására általában a szerkesztőbizottság felkérésére kerülhet sor, illetve az erre irányuló szándékot célszerű előzetesen egyeztetni a szerkesztőbizottsággal.

2. Közleményeket, legfeljebb 12 gépelt oldal terjedelemben. Az ábrák és táblázatok együttes száma maximálisan 10 lehet.

3. Rövid közleményeket, legfeljebb 4 gépelt oldal terjedelemben (összesen legfeljebb 4 ábra és táblázat). A közlemények megjelenési sorrendjében a rövid közlemények előnyt élveznek.

4. Ph.D. értekezések összefoglaló közleményét, legfeljebb 25 oldal terjedelemben.

Feleslegesen nagy terjedelmű dolgozatok esetében a szerkesztőbizottság fenntartja magának a jogot arra, hogy a lektori javaslatok alapján a szerzőt felkérje dolgozatának rövid közleménnyé való átdolgozására.

### A kézirat elkészítésének módja:

#### a) Általános szempontok

A kéziratot elektronikusan, csatolt file-ként kell a felelős szerkesztő e-mail címére elküldeni: zelrom@gytk.sote.hu

A táblázatokat külön file-ként, címmel és római sorszámmal ellátva készítsük.

Az ábrák és egyéb illusztrációk olyan színvonalon készüljenek, hogy azok nyomdai szerkesztésre alkalmasak legyenek. Az ábrákat külön file-ként kell csatolni, az elnevezésben az ábraszámokat fel kell tüntetni. Javasolt formátum: jpg, tiff.

Az irodalmi hivatkozásokat külön, a hivatkozások sorrendjében közöljük. A hivatkozási számot a szövegben tegyük szögletes zárójelbe.

#### A hivatkozások módja:

##### Folyóiratcikk:

Teljes URL cím a keresőablakból kimásolva és az elérés dátuma, az alábbiak szerint:

1. Revelle, L. K., Musser, S. M., Rowe, B. J., Feldmann, I. C.: J. Pharm. Sci. 86, 631-634 (1997)

##### Szakkönyv:

2. Gyarmati L., Rácz I., Plachy J., Csontos A.: A gyógyszer-technológia és biofarmácia kémiai ellenőrző módszerei. Medicina, Budapest, 1982. 147-152. old.

##### Könyvfejezet:

3. Ariens, E. J.: Racemates – an impediment in the use of drugs and agrochemicals. In: Krstulovic, A.M. (ed): Chiral Separations by HPLC. Ellis Horwood, Chichester, 1989. pp. 31-68.

### Szabadalom:

4. U.S. Pat. 3 425 422 (1984)

### Konferencia-előadás:

5. Duncan, R.: Polymer therapeutics: Targeting drugs and genes to tumours. 6<sup>th</sup> European Congress of Pharmaceutical Sciences. Eur. J. Pharm. Sci. 11, (2000) S1-S2.

Internetes hivatkozás: teljes URL-cím a keresőablakból kimásolva és az elérés dátuma az alábbiak szerint

6. <http://www.eum.hu/main.php?folderID=3746&objectID=6000268> [2008. 08. 05.] Az Egészségügyi Minisztérium szakmai protokollja - Gyógyszeres fájdalomcsillapítás és gyulladásátlás a reumatológiai betegségekben.

Az idegen orvosi kifejezések helyesírásában Fábíán P. és Magasi P.: Orvosi helyesírási szótár. Akadémiai Kiadó, 1992. legyen az irányadó, a kémiai kifejezések nevezéktanára és helyesírására vonatkozóan pedig Erdey-Grúz T és Csányi P.: A kémiai elnevezés és helyesírás szabályai. Akadémiai Kiadó, 1972. F. Csányi P., Fábíán P. és Hőnyi E.: Kémiai helyesírási szótár. Műszaki Kiadó, 1982., valamint F. Csányi P. és Simándi L.: Szeretlen kémiai nevezéktan. Magyar Kémikusok Egyesülete, 1995.

A mértékegységek megjelölésében az SI-mértérendszer szabályai az irányadók.

### b) A kézirat felépítése

A kézirat szerkesztéséhez a következő beosztást kérjük:

A dolgozat címe (esetleg alcíme).

A szerző(k) teljes neve (tudományos fokozatok nélkül), a szerkesztőséggel kapcsolatot tartó szerző neve csillaggal megjelölve.

A szerző(k) munkahelye teljes postai címmel, valamint a levelező szerző e-mail címe.

A dolgozat magyar nyelvű összefoglalása.

A magyar nyelvű összefoglalás terjedelme a dolgozat hosszától függően 10-20 sor legyen és az általános megfogalmazások kerülésével tartalmazza a dolgozat legfontosabb, konkrét megállapításait.

Kulcs-szavak: A dolgozat tartalmára utaló, maximum 5 kulcs-szó megadása.

A dolgozat címe angol nyelven, a szerző(k) neve. (keresztnevek rövidítve).

Angol nyelvű összefoglalás.

Bevezetés, amely tartalmazza a munka célkitűzéseit, valamint a vizsgálatok előzményeiből és irodalmi háttéréből annyit, amennyi a dolgozat megértéséhez és értékeléséhez szükséges.

Key-words: A dolgozat tartalmára utaló, maximum 5 kulcs-szó angol nyelvű fordítása.

Kísérleti rész, amely tartalmazza a felhasznált eszközök és anyagok, valamint a kidolgozott módszerek pontos leírását.

### Eredmények.

A dolgozatok csak a leírt módszerek teljesítőképességét megfelelően dokumentáló adatokkal fogadhatók el. Ezek megadásánál használjuk a matematikai statisztika korszerű módszereit.

Az eredmények értékelése.

### Ábracímek.

Következtetések. Az utóbbi két fejezet összevonható az Eredmények c. fejezettel.

Az esetleges köszönetnyilvánítások.

Irodalomjegyzék.